

UNIVERSITE DE SHERBROOKE
Faculté des sciences appliquées

PRODUCTION DE CANDIDA UTILIS
A PARTIR DE LA FERMENTATION D'EXTRAITS DE TOURBE

Mémoire de maîtrise ès sciences appliquées
spécialité: génie chimique

Philippe Quierzy

SOMMAIRE

La production d'une biomasse protéinique a été réalisée par la croissance de Candida utilis sur des hydrolysats de tourbe riches en sucres.

L'hydrolyse acide de la tourbe a été effectuée sous des conditions de température variant de 127°C à 165°C et des temps de contact de 0.3h à 4h. Le rendement optimum, avec 280 mg sucre/g tourbe sèche, a été obtenu pour des conditions de 152°C et un temps de contact de 1h.

L'étude de la croissance de Candida utilis sur erlenmeyer montre que l'hydrolysate nécessite l'addition d'azote et de phosphore pour constituer un milieu de fermentation adéquat.

Des quantités de 5 g/l de K_2HPO_4 et 4.8 g/l d'azote répondent de façon satisfaisante à ces exigences.

L'étude de la fermentation dans un réacteur de 7l est réalisée en régime discontinu et continu. L'influence de la variation du taux de dilution sur la biomasse et la concentration résiduelle en sucre est étudiée. Il est montré qu'une productivité maximale de $1.24\text{g l}^{-1}\text{h}^{-1}$ est obtenue pour un taux de dilution de 0.724h^{-1} pour une concentration en substrat de 34g/l.

Les résultats expérimentaux obtenus ont été comparés avec les prédictions du modèle de MONOD.

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{\max} \frac{SX}{K_s + S}$$

$$\frac{dS}{dt} = - \frac{1}{Y} \frac{dX}{dt}$$

Des méthodes d'estimation linéaires et non-linéaires sont considérées pour l'obtention des paramètres μ_{\max} , K_s et Y .

Les prédictions obtenues de l'intégration du modèle sont discutées à la lueur des hypothèses faites pour ce modèle et les résultats expérimentaux notés.

Contrairement à une des hypothèses du modèle posé, il est observé expérimentalement que le rendement instantané $Y(t)$ varie et qu'il semble refléter l'utilisation de divers substrats contenus dans l'hydrolysats de tourbe par Candida utilis. La considération de ce fait dans l'établissement d'un modèle adéquat est discutée.

REMERCIEMENTS

Je désire remercier tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce mémoire.

Les remerciements s'adressent plus particulièrement à monsieur Normand Thérien, mon directeur de recherche, et monsieur Anh LeDuy, qui ont bien voulu m'orienter sur le sujet traité et m'assister de leurs conseils.

Je veux aussi remercier Michel De Broissia, les étudiants, et les techniciens du Département de génie chimique qui ont été d'un grand secours en de multiples occasions, sans oublier l'organisation France-Québec pour sa bourse d'étude.

TABLE DES MATIERES

SOMMAIRE	i
REMERCIEMENTS	iii
TABLE DES MATIERES	iv
LISTE DES FIGURES	vi
LISTE DES TABLEAUX	viii
INTRODUCTION	1
1. BIBLIOGRAPHIE	3
1.1 Importance des protéines d'origine microbienne	3
1.2 Composition chimique de la tourbe	10
1.3 Méthodes d'hydrolyse de la tourbe	12
1.4 Fermentations envisageables à partir de l'hydrolysate de tourbe	15
1.5 Choix de la souche utilisée	16
2. METHODES ANALYTIQUES	19
2.1 Détermination de la biomasse	19
2.2 Détermination des carbohydrates totaux	19
2.3 Mesure du pH	22
3. TRAITEMENT DE LA TOURBE ET OBTENTION DE L'EXTRAIT	23
3.1 Introduction	23
3.2 Methodologie expérimentale	23
3.3 Résultats expérimentaux - Discussion	25
3.4 Obtention d'un extrait en quantité importante	34

4. METHODOLOGIE DES FERMENTATIONS	36
4.1 Conservation de la souche et inoculation des fermentations	36
4.2 Description du système de fermentation	37
4.3 Opération du fermenteur en discontinu	43
4.4 Opération du fermenteur en continu	44
5. FERMENTATION DISCONTINUE	49
5.1 Fermentation en erlenmeyer sur agitateur rotatif	49
5.2 Fermentation discontinue sur fermenteur CHEMAP 007	58
6. FERMENTATION CONTINUE	74
6.1 Introduction	74
6.2 Théorie de la fermentation continue	74
6.3 Etude de la variation du taux de dilution	77
6.4 Résultats expérimentaux - Discussion	79
6.5 Etude de la stabilité du système au taux de dilution optimum	83
7. LISSAGE ET MODELISATION DES RESULTATS EXPERIMENTAUX	86
7.1 Introduction	86
7.2 Calcul des paramètres du modèle de MONOD par une méthode indirecte	87
7.3 Calcul des paramètres du modèle de MONOD par une méthode directe	105
CONCLUSION	112
ANNEXE A: <u>Candida utilis</u>	114
ANNEXE B: Programmes "Fortran" utilisés	120
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	134

LISTE DES FIGURES

Figure 1	Prix et production de farine de soja	6
Figure 2	Courbe d'étalonnage du dosage des sucres	21
Figure 3	Rendement en sucres en fonction de la température pour plusieurs temps de séjour	29
Figure 4	Variation du rendement maximum en fonction du temps de contact	30
Figure 5	Variation du rendement et de la concentration en sucres en fonction de la concentration en tourbe	32
Figure 6	Schéma simplifié du fermenteur	38
Figure 7	Courbe d'étalonnage du débitmètre	40
Figure 8	Schéma d'installation du fermenteur	41
Figure 9	Schéma de l'alimentation en acide base	42
Figure 10	Courbe d'étalonnage de la pompe	45
Figure 11	Alimentation du fermenteur en continu	46
Figure 12	Gradient de température dans une bouteille de 20ℓ pendant la stérilisation	48
Figure 13	Croissance de <u>C. utilis</u> sur hydrolysats neutralisés avec la soude	53
Figure 14	Croissance de <u>C. utilis</u> sur hydrolysats neutralisés avec l'ammoniaque	54
Figure 15	Croissance de <u>C. utilis</u> sur hydrolysats traités au charbon actif	55
Figure 16	Croissance de <u>C. utilis</u> sur hydrolysats enrichis avec de l'azote et du phosphore	56
Figure 17	Effet de l'addition d'antimousse sur la croissance de <u>C. utilis</u>	59
Figure 18	Croissance de <u>C. utilis</u> (FB1)	62

Figure 19	Croissance de <u>C. utilis</u> (FB2)	63
Figure 20	Croissance de <u>C. utilis</u> (FB3)	64
Figure 21	Variation du logarithme de la biomasse au cours du temps	70
Figure 22	Correlation graphique biomasse - soude versée	73
Figure 23	Fermentation continue (1 ^{ière} partie)	78
Figure 24	Etude de l'effet de la variation du taux de dilution	81
Figure 25	Fermentation continue (2 ^{ième} partie)	85
Figure 26	Lissage de $X(t)$ pour FB1	92
Figure 27	Lissage de $S(t)$ pour FB1	93
Figure 28	Calcul de la dérivée première de $X(t)$ pour FB1	94
Figure 29	Lissage de $S(t)$ pour FB2	95
Figure 30	Lissage de $X(t)$ pour FB2	96
Figure 31	Calcul de la dérivée première de $X(t)$ pour FB2	98
Figure 32	Intégration des équations du modèle de MONOD (FB1)	101
Figure 33	Intégration des équations du modèle de MONOD (FB2)	102
Figure 34	Rendement instantané en fonction du temps	104
Figure 35	Lissage des cinétiques de FB1 par la méthode directe	108
Figure 36	Lissage des cinétiques de FB2 par la méthode directe	109
Figure 37	Lissage des cinétiques de FB1 sans utiliser le premier point expérimental	110

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1	Sources non-conventionnelles de protéines	4
Tableau 2	Usines de production de "Single cell protein"	5
Tableau 3	Temps de doublement de la biomasse	8
Tableau 4	Teneur en protéines de différentes sources	8
Tableau 5	Caractéristiques biochimiques de quelques souches utilisées pour la production de levures alimentaires	18
Tableau 6	Effet catalyseur de l'acide sulfurique sur la réaction d'hydrolyse de la tourbe	26
Tableau 7	Etude du temps de contact et de la température	28
Tableau 8	Etude de la concentration en tourbe	31
Tableau 9	Effet de l'addition d'éléments nutritifs sur l'hydrolysât brut	52
Tableau 10	Fermentation FB1	65
Tableau 11	Fermentation FB2	66
Tableau 12	Fermentation FB3	67
Tableau 13	Rendement des fermentations discontinues	68
Tableau 14	Résultats expérimentaux de la fermentation continue	80
Tableau 15	Caractéristiques physiologiques de <u>Candida utilis</u>	119

INTRODUCTION

Actuellement l'homme doit faire face à plusieurs problèmes fondamentaux (crise de l'énergie, pollution, etc...) qu'il se doit de résoudre rapidement. Parmi ceux-ci, le problème de l'alimentation prend une place de plus en plus importante. En effet, le monde s'approche rapidement du point où l'homme ne pourra plus dépendre seulement de l'agriculture pour satisfaire la demande en protéines.

Il doit donc se tourner, dès aujourd'hui, vers d'autres voies de synthèse. Aussi une des nouvelles sources de protéines est celle d'origine microbiologique: les "Single cell protein" ou protéines microbiennes. Elles proviennent de la biomasse des microorganismes qui utilisent essentiellement des sources de carbone, azote, phosphore et de l'air pour leur croissance.

La nécessité de disposer d'une matière première bon marché a orienté la production des "Single cell protein" vers l'utilisation des rejets industriels ou agricoles comme substrat. C'est ainsi que l'utilisation de l'effluent produit lors du traitement de la tourbe en vue de sa déshydratation a été envisagée.

En effet dans le but de fabriquer des briquettes de tourbe utilisables comme combustible, on doit effectuer un traitement de la tourbe dans un autoclave. Ce procédé de carbonisation humide a pour effet de briser les liaisons colloïdales de l'eau, et ainsi d'en permettre plus facilement l'extraction. On obtient alors, un effluent riche en matières organiques, principalement en sucres qui proviennent de l'hydrolyse du matériel cellulosique. La liqueur, ainsi produite,

peut alors être utilisée par voie microbiologique pour la production de levures alimentaires. Ceci a pour conséquence de diminuer le coût du procédé de fabrication des briquettes tout en réduisant simultanément la pollution.

En URSS, il a été établi que le procédé pouvait être rentable et ainsi développé. Celui-ci est maintenant opérationnel à l'échelle industrielle.

En constatant que le Canada est la 3^{ème} plus grande réserve de tourbe au monde, nous avons été conduit à examiner l'intérêt de produire des levures à partir d'un hydrolysate de tourbe issu de différentes utilisations industrielles de celle-ci.

Le projet comprend deux étapes principales:

- l'étude brève de l'hydrolyse de la tourbe dans le but de connaître ses conditions optimales (pression, température, concentration en tourbe, etc...) et d'obtenir une liqueur nutritive pour la croissance des levures.
- l'étude de la croissance de Candida utilis qui est constituée de trois parties:
 - mise en évidence des limitations possibles de la croissance;
 - étude de la fermentation de C utilis en régime discontinu;
 - étude de la fermentation de C utilis en régime continu.

CHAPITRE I

BIBLIOGRAPHIE

1.1 Importance des protéines d'origine microbienne.

On s'accorde à penser que l'homme ne pourra plus seulement dépendre de l'agriculture pour satisfaire la demande en protéine alimentaire. Il devient donc nécessaire de se tourner vers de nouvelles sources pour éviter une pénurie.

Parmi les sources non conventionnelles de protéines (tableau 1), l'une des plus prometteuses est celle provenant des micro-organismes (S.C.P.). Ceux-ci utilisent comme substrat principal une source de carbone.

- pétrole
- déchets urbains et agricoles
- ressources renouvelables (cellulose, CO_2).

L'idée n'est pas nouvelle puisque lors de la première guerre mondiale, l'Allemagne a produit des levures à partir d'eaux résiduelles de l'industrie du bois. Mais ce n'est qu'aujourd'hui que la production de protéines microbiennes est devenue une réalité. Une production de plus de un million de tonnes est envisagée pour les années à venir. Le tableau 2 détaille l'importance de cette production à travers différents pays. La figure 1 nous donne une idée du potentiel économique des protéines alimentaires.

Devant un développement si rapide, on est amené à se deman-

TABLEAU 1

SOURCES NON-CONVENTIONNELLES DE PROTEINES ⁽²⁰⁾

1. SOURCES NON-MICROBIENNES

- Oléagineux: soja, arachides (établie)
- Farines de poisson: (semi-établie)
- Plantes: (en développement)

2. SOURCES MICROBIENNES

- Dioxyde de carbone (en développement)
- Carbohydrates
 - *Sucres: Mélasses (établie)
Liqueurs sulfiteuses (établie)
Petit lait (semi-établie)
 - *Amidon: Grain, manioc, eaux résiduaires des industries de la pomme de terre
 - *Cellulose: Bois, papier, bagasse, déchets solides d'origine domestique ou urbaine (en développement)
- Hydrocarbures: n -alcanes (établie)
Méthanol (semi-établie)
Méthane (en développement)

TABLEAU 2

USINES DE PRODUCTION DE "SINGLE CELL PROTEIN" (36)

BASE	STATUT	PAYS	TONNES/AN
<u>A. Petrole</u>			
Gas oil	o	France	20,000
n- paraffines	o	Ecosse	4,000
	a	Tchécoslovaquie	700,000
		Italie, G.B., URSS	
		Vénézuela	
Méthanol	a	Roumanie, G.B.	165,000
Ethanol	a	Tchécoslovaquie, USA	105,000
<u>B. Eaux Résiduaire</u>			
de papeterie	o	Allemagne, Suisse, USA, URSS,	170,000
de sucrerie	o	Taiwan	12,000
petit lait	o	France, USA	6,000
amidon	o	G.B.	450
hydrolysate de bois	o	URSS	10,000
<u>C. Eaux Résiduaire</u>			
<u>urbaines et agricoles</u>			
Fumier	o	USA	pilote
Eaux d'égout	o	Allemagne	200
<u>D. Divers</u>			
CO ₂	o	Mexique	350
		Total opérant(o)	313,000
		Annoncé (a)	970,000

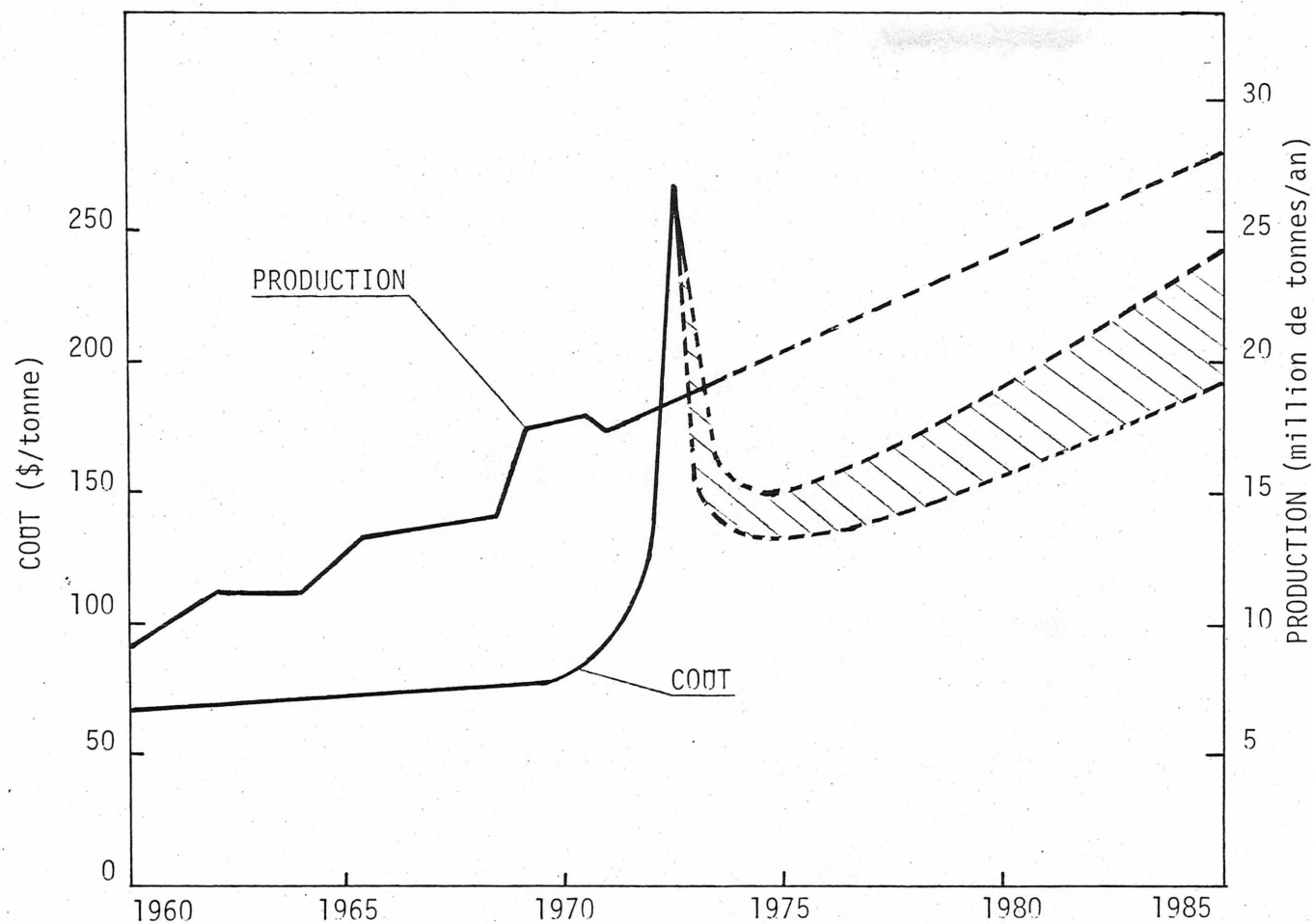


FIGURE 1: PRIX ET PRODUCTION DE FARINE DE SOJA⁽⁸⁾
(projetés jusqu'en 1985)

der quels sont les avantages des protéines microbiennes.

Les microorganismes constituent une source pratiquement inépuisable de protéines puisque ceux-ci utilisent des composés carbonés qui se trouvent en très grande quantité et même renouvelables. De plus l'utilisation de certains déchets peut nous permettre de résoudre simultanément le problème de la pollution.

D'autres avantages montrent pourquoi les microorganismes peuvent être une voie économique pour produire des protéines. L'examen du tableau 3 nous montre que le temps nécessaire pour doubler la biomasse est de l'ordre de quelques minutes pour les microorganismes, alors qu'il est de l'ordre de jours pour les plantes, et de semaines ou mois pour les animaux.

La croissance de la biomasse dans le fermenteur peut être contrôlée de façon optimale pour l'homme, et de ce fait n'est pas affectée par les conditions climatiques comme dans l'agriculture. De plus, la production n'est pas limitée par l'étendue des surfaces cultivables ou par l'ensoleillement.

Les protéines microbiennes peuvent être facilement préservées par séchage et ainsi leur durée de conservation en est augmentée.

Finalement la teneur en protéines (tableau 4) est relativement importante. Les "Single cell protein" sont généralement comparables aux farines de poissons (60-70% de protéines) et celles de levures sont semblables aux farines de soja (45-55% de protéines).

Mais nous sommes en droit de nous demander s'il y a des dangers à consommer des protéines microbiennes? Il n'y en a pas dans la mesure où certains standards sont respectés:

TABLEAU 3TEMPS DE DOUBLEMENT DE LA BIOMASSE⁽²⁰⁾

<u>Organismes</u>	<u>Temps moyen pour doubler une fois la biomasse</u>
Bactéries et levures	10-120 minutes
Fungi et algues	2-6 heures
Plantes agricoles	1-2 semaines
Volailles	2-4 semaines
Porcs	4-6 semaines
Boeuf	1-2 mois

TABLEAU 4TENEUR EN PROTEINES DE DIFFERENTES SOURCES⁽²⁰⁾

<u>Sources</u>	<u>Contenu en protéines (%)</u>
Boeuf	15.2
Porc	11.6
Volaille	20.0
Lait déshydraté non écrémé	36.0
Concentré de soja	68.0
Farine d'arachides	59.0
Levures cultivées (S.C.P.)	
-sur mélasse	53.
-sur n - alcanes	53.

- digestibilité
- valeur nutritive
- toxicité, etc...

En ce qui concerne la digestibilité, une attention toute spéciale doit être apportée pour réduire la concentration en acide nucléique. Pour l'alimentation animale, cet enlèvement n'est pas indispensable. Pour les protéines synthétisées à partir d'hydrocarbures, on doit veiller à enlever scrupuleusement tous composants résiduels ayant une nature cancérogène possible. Apparemment, les standards de consommation ont été satisfaits comme le montrent tous les produits contenant des protéines microbiennes mis en vente sur le marché. Actuellement, une grande partie est utilisée comme additif à l'alimentation des animaux.

Du point de vue économique un article récent ⁽³⁶⁾ montre le rôle important des protéines microbiennes sur le marché. Les prix envisagés varient dans une gamme de 600 à 1200 dollars la tonne à 100% de protéines alors que la farine de soja à 44% de protéines est de l'ordre de 264 à 528 dollars la tonne.

La nouvelle production prévue ne fera peut être pas baisser les prix mais établira un plafond au prix de la farine de soja. Elle régularisera ainsi le marché. D'autre part, si la pénurie de protéines devient une réalité immédiate, les matières premières et la technologie sont disponibles.

1.2 Composition chimique de la tourbe.

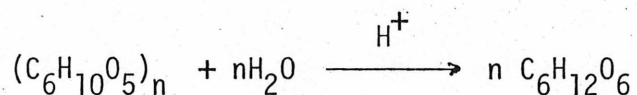
La tourbe est une matière très hétérogène variant avec sa formation et son origine. En général, elle peut être définie⁽¹⁰⁾ comme un matériau qui dérive de substances organiques mortes, principalement de plantes, après une décomposition anaérobique incomplète. C'est une étape intermédiaire dans la voie de la carbonisation.

Les constituants principaux de la tourbe sont la cellulose et l'hémicellulose, la lignine et les acides humiques, les résines et les cires. Comme produits secondaires nous trouvons les pentosanes, les sucres et les composés minéraux.

La proportion de ces composés dans la tourbe dépend du degré de décomposition (humification). Protéines, mono et disaccharides, et celluloses sont rapidement décomposés alors que la proportion de lignine et d'hémicellulose s'accroît.

Les résultats d'analyses effectuées sur une tourbe du Québec⁽²⁵⁾ montrent que le pourcentage de cellulose et d'hémicellulose, particulièrement dans les couches supérieures, est généralement plus grand que 15%. Le pourcentage de lignine et d'acides humiques varie de 50 à 65% spécialement dans les couches profondes. En ce qui concerne les composés minéraux, une moyenne de 2.5% de cendres dans la tourbe sèche est constatée. Ces cendres sont composées d'oxydes de différents métaux et métalloïdes (SiO_2 , Al_2O_3 , Fe_2O_3 , CaO , MgO , K_2O , Na_2O , TiO_2 , MnO , SO_3 , CO_2 , P_2O_5).

La tourbe riche en cellulose, hémicellulose et pentosanes peut donc constituer une matière première pour obtenir un milieu de fermentation. Pour transformer la matière cellulosique en carbohydrates assimilables, la tourbe doit subir une hydrolyse; celle-ci s'effectue par fixation d'une molécule d'eau en présence d'un acide comme catalyseur. Cette transformation se fait selon le schéma suivant:



Pendant l'hydrolyse de la cellulose, une seconde réaction se produit; celle de la destruction des sucres; cette réaction est très complexe; il se forme des glucosannes, de l'acide formique, du furfural et de l'acide leucélinique. Lors de cette transformation, le lignine et les acides humiques (lesquels passent dans le résidu) peuvent se transformer en produits assimilables. D'autre part, les constituants minéraux passent en solution lors de l'hydrolyse. De ce fait, on voit donc que la liqueur contenant les sucres, source d'énergie et de carbone, peut être utilisée pour des fermentations. Le résidu obtenu, ayant très peu de cendres, peut être utilisé pour faire du charbon actif ou du carbone industriel si l'élaboration de briquettes n'est pas envisagée.

Les carbohydrates, obtenus de l'hydrolyse du matériel cellulosique, sont le glucose, le xylose et dans une plus basse concentration le galactose et l'arabinose⁽³³⁾.

1.3 Méthodes d'hydrolyse de la tourbe.

Les méthodes employées pour traiter la tourbe, en vue d'obtenir un milieu de fermentation, ont été aussi nombreuses que variées. Les premiers essais d'hydrolyse de la tourbe ont été effectués en 1898 par FEILITZEN et la première tentative à l'échelle industrielle remonte à 1905, 1906. Des acides minéraux sous pression étaient utilisés. Plus tard, l'hydrolyse de la tourbe a été effectuée,

- avec des acides minéraux sans augmentation de pression (MOSER 1921);
- avec des acides minéraux sous pression (MINSK 1935);
- sous pression sans acides minéraux (ELMANOVICH 1925).

Aujourd'hui une nouvelle méthode est envisagée: une hydrolyse enzymatique des polysaccharides de la tourbe⁽¹³⁾ avec la cellulase du fungus Trichoderma lignorum, isolée des couches inférieures de tourbière. Cette méthode de digestion de la cellulose suscite un grand intérêt vu la grande quantité de la matière organique, contenant de la cellulose, qui est disponible dans la nature.

Jusqu'à aujourd'hui, la dégradation des substances hydrolysables de la tourbe en sucres fermentescibles, a été réalisée par voie chimique et non biologique.

Pendant la seconde guerre mondiale, des études ont été réalisées en France⁽⁵⁾ pour obtenir les conditions optimales d'hydrolyse de la tourbe. Les essais ont été réalisés dans un autoclave équipé

d'un système d'agitation. Les premières tentatives, effectuées à pression ordinaire (1 atm) n'ont donné que des traces de sucres. Les mêmes auteurs, en réalisant des essais sous pression, ont montré que le rendement maximum est obtenu pour une température de 167°C , soit sous une pression de 7.3 atmosphères pour un temps de contact d'une heure. En faisant varier celui-ci, les auteurs montrent que la température optimale est constante mais que le rendement varie. Le rendement maximum est obtenu pour un temps de contact d'une heure. Si on augmente celui-ci, le rendement baisse; c'est la réaction de destruction des sucres qui devient prépondérante sur la réaction d'hydrolyse. L'étude de l'addition d' H_2SO_4 (employé en solution de 1% à raison de 10 fois, en volume, le poids de tourbe sèche utilisée) montre que le rendement en sucre est nettement augmenté à pression ordinaire. Sous pression à 135°C , on obtient un rendement maximum (27.2 g de dextrose/100 g de tourbe sèche) pour un temps de 2.5 heures. Les auteurs ont ensuite augmenté la concentration en acide pour étudier l'action de ce dernier sur le rendement en sucres réducteurs. Ils ont travaillé à 2.5% pour atteindre le même maximum mais avec un temps moins long. Il semble qu'un rendement supérieur à 21% ne puisse être obtenu pour ce genre de tourbe.

STRELKOV⁽³³⁾ rapporte que l'hydrolyse de la tourbe est maintenant effectuée à grande échelle en URSS.

La tourbe ayant une humidité de $72 \pm 2\%$ est traitée en discontinu dans un autoclave à $185^{\circ} \pm 5^{\circ}\text{C}$ pendant 20 minutes. L'autoclave est porté à une pression de 12.5 ± 0.5 atm avec de la vapeur vive. Le cycle entier du traitement thermique prend environ 65 minutes. A

la fin du traitement l'autoclave est dépressurisé et la vapeur condensée pour recueillir le furfural.

La tourbe traitée est comprimée pour en extraire le liquide contenant les carbohydrates hydrosolubles. L'étude du procédé montre que plus de 25% de la concentration initiale en sucre dans la tourbe se trouve dans la liqueur obtenue après traitement. Mais celui-ci peut s'accroître jusqu'à 45-50%. Le reste est, en partie incomplètement hydrolysé et en partie décomposé pendant le traitement.

Les bilans effectués sur le procédé donnent les rendements suivants:

- furfural provenant de la condensation de la vapeur:
3-4 kg de furfural/tonne de briquettes à 38-40% d'humidité;
- alcool éthylique provenant de la fermentation de la liqueur: 3-5 ℓ d'alcool/ m^3 de liqueurs avec un potentiel de 8 ℓ/m^3 ;
- tous les sucres n'étant pas utilisés dans le procédé de fermentation, les auteurs prévoient de les transformer en acides organiques.

En conclusion, STRELKOV⁽³³⁾ pense que l'utilisation des carbohydrates de la tourbe deviendra aussi répandue que celle de l'hydrolyse du bois en URSS.

Plus récemment, MAC LOUGHLIN et KUSTER ont examiné dans une première étape⁽¹⁶⁾, différentes méthodes d'extractions des sucres. Ils concluent qu'un traitement sous pression en présence d'acide conduit aux meilleurs résultats. Les résultats obtenus sont difficilement

exploitables car ils ne sont pas rapportés en terme de rendement (sucres extraits/masse de tourbe sèche traitée). Dans une autre étude⁽¹⁸⁾, ils démontrent que c'est la fraction d'hémicellulose qui est hydrolysée.

1.4 Fermentations envisageables à partir de l'hydrolysats de tourbe.

L'hydrolysats de tourbe, riche en carbohydrates, contenant d'autres produits organiques pouvant être assimilables, a permis d'envisager son utilisation comme milieu nutritif de fermentation.

La fermentation peut avoir pour but, l'obtention de solvants industriels. Ceci a été étudié⁽⁵⁾ lors de la seconde guerre mondiale pour produire de l'alcool éthylique. STRELKOV⁽³³⁾ utilise également les sucres pour produire de l'éthanol. Mais la production par l'industrie pétrochimique est beaucoup plus rentable. Les procédés microbiologiques de production de solvant industriel ne présente actuellement qu'un faible intérêt.

L'étude de la fermentation méthanique a aussi été envisagée⁽⁵⁾ à partir des hydrolysats de tourbe. Elle reprend maintenant une certaine importance devant la crise de l'énergie.

Mais la principale utilisation des hydrolysats de tourbe est faite en vue d'obtenir la biomasse riche en protéines de certaines levures. De nombreuses études^(28,29,30,35) ont été réalisées en Russie en vue de produire des levures alimentaires. Toutefois la difficulté de traduction et les coûts impliqués ne permettent pas toujours une consultation immédiate et efficace. En Irlande, MAC LOUGHLIN et KUSTER⁽¹⁷⁾ montrent qu'avec l'addition de phosphates,

l'hydrolysate peut constituer un milieu nutritif adéquat pour la croissance de la levure Candida utilis.

1.5 Choix de la souche utilisée.

De nombreux types de microorganismes ont été étudiés en vue de la production de protéines. L'utilisation de bactéries tel Escherichia coli ⁽¹²⁾ a l'intérêt de produire des protéines qui ne sont pas déficientes en méthionine ou en cystéine, comme le sont celles des protéines d'un certain nombre de fungi. Actuellement, étant donné que nous disposons de déchets cellulosiques en quantité considérable, les bactéries (les espèces de Cellulomonas) qui utilisent la cellulose, sont d'un intérêt considérable. La culture de bactéries est limitée par plusieurs facteurs importants. La stérilisation est une considération importante puisque des bactéries indésirables (pathogènes) peuvent se développer aussi rapidement que la bactéries désirées. Aussi, sait on maintenir des conditions de stérilité parfaite tout au long de la croissance. D'autre part, du fait de la faible taille des bactéries ($0.5-2 \mu$), la séparation de la biomasse du milieu de culture augmente considérablement le coût de production.

Les champignons et moisissures constituent aussi une source intéressante de protéines et de vitamines. Le mycellium ainsi produit, contient 35 à 45% de protéines assimilables. Des études ont été réalisées pour produire industriellement le mycellium de la morille ⁽³⁷⁾ en cuve aérée et agitée.

Mais les espèces recevant le plus d'attention sont les levures. Beaucoup de souches ont été considérées pour la production de levures alimentaires. Les principaux impératifs auxquels doivent répondre les souches utilisées dans le but d'obtenir des protéines alimentaires sont les suivants:

- croissance vigoureuse;
- possibilité d'utiliser des substrats variés;
- rendement élevé;
- résistance aux contaminants et aux composés toxiques;
- croissance dans une large gamme de température et de pH;
- stabilité génétique.

Les exigences ont entraîné l'emploi de certaines souches de Candida ou de leurs mutants à la place de Saccharomycès. Ainsi S. cerevisiae a les désavantages de ne pas être apte à utiliser des pentoses et de nécessiter des sources organiques d'azote et des vitamines du groupe B.

Parce qu'elle attaque plus de composés carbonés et azoté que d'autres levures communes, Candida utilis est favorisée industriellement pour modifier les mélasses, hydrolysats de bois, liqueurs sulfiteuses, eaux résiduaires d'industries alimentaires. Le tableau 5 montre l'habileté de diverses souches de levures à dégrader certains composés carbonés.

Etant donné que notre hydrolysat contenait une grande variété de composés carbonés et en particulier des pentoses provenant de l'hydrolyse de la fraction d'hémicellulose, nous avons porté notre choix sur Candida utilis. L'annexe A est consacrée aux caractéristiques de C. utilis.

TABLEAU 5

CARACTERISTIQUES BIOCHIMIQUES DE QUELQUES SOUCHES UTILISEES
 POUR LA PRODUCTION DE LEVURES ALIMENTAIRES ⁽¹⁴⁾

Substrat	Saccharo- myces cerevisiae	Saccharo- myces carlsber- gensis	Saccharo- myces fragilis	Candida utilis	Candida tropicalis
Glucose	+	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	-	+
Maltose	+	+	+	+	+
Sucrose	+	+	-	+	+
Lactose	-	-	+	-	-
Xylose	-	-	-	+	+
KNO ₃	-	-	-	+	-
Ethanol	<u>+</u>	-	+	+	-
Taille moyenne (μ)	5x9	7x9	4x6	4x7	7x9

- + Assimilation
- + Faiblement positive
- Pas de croissance

CHAPITRE 2

METHODES ANALYTIQUES

2.1 Détermination de la biomasse.

Un certain volume d'échantillon est filtré et par pesée du résidu, on mesure la concentration en microorganismes.

Les filtres employés sont des filtres Gelman dont les pores ont 0.45μ de diamètre (METRICEL, type GM, Gelman Instrument Co. Ltd.).

Le séchage des filtres s'effectue pendant 3 heures à 105°C . De 5 à 10 ml de milieu sont filtrés sous vide; le résidu est lavé avec 10 ml d'eau distillée pour entraîner les sels minéraux. Puis on sèche à 105°C jusqu'à ce que le poids soit constant.

Cette méthode donne de bons résultats mais a l'inconvénient d'être longue.

2.2 Détermination des carbohydrates totaux.

2.2.1 Principe.

Lorsque des sucres ou des polysaccharides sont traités avec l'anthrone dans une solution concentrée d'acide sulfurique, une couleur bleue est obtenue⁽²²⁾.

L'intensité de la couleur donnée par l'amidon ou la cellulose est approximativement la même que celle obtenue d'une quantité égale de glucose^(21,22). Puisque glucose et fructose donnent prati-

quement la même intensité de couleur, un mélange de glucose, fructose, sucrose, amidon et cellulose peut être dosé en se référant au glucose.

2.2.2 Réactifs utilisés.

Deux grammes d'anthrone ($C_6H_4COC_6H_4CH_2$, Baker grade, J.T. Baker Chemical Co.) sont dissouts dans 1 litre d'acide sulfurique (H_2SO_4 , Baker analysed reagent, J. T. Baker Chemical Co.) à 95% (préparé par l'addition de 1 litre d' H_2SO_4 concentré et de 50 g d'eau).

2.2.3 Procédure.

Trois millilitres de solution contenant 50 à 300 g. de glucose sont pipettés dans un tube à essai avec bouchon vissé recouvert de teflon. Ensuite, 6 mL de réactif à l'anthrone sont ajoutés avec une pipette automatique. L'utilisation de celle-ci permet d'obtenir un mélange rapide et reproductible. Ceci est très important car l'énergie d'activation de la réaction est fournie par la chaleur de mélange de l'acide sulfurique dans l'eau. Il est donc très important que la même température soit atteinte dans chaque tube⁽¹¹⁾. Après refroidissement à température ambiante, le pourcentage de transmission est lu sur un spectrophotomètre à double faisceau (Coleman 124, Perkin Elmer Co.) avec une longueur d'onde de 540 nm en utilisant un blanc (3 mL d'eau distillée + 6 mL de réactif à l'anthrone).

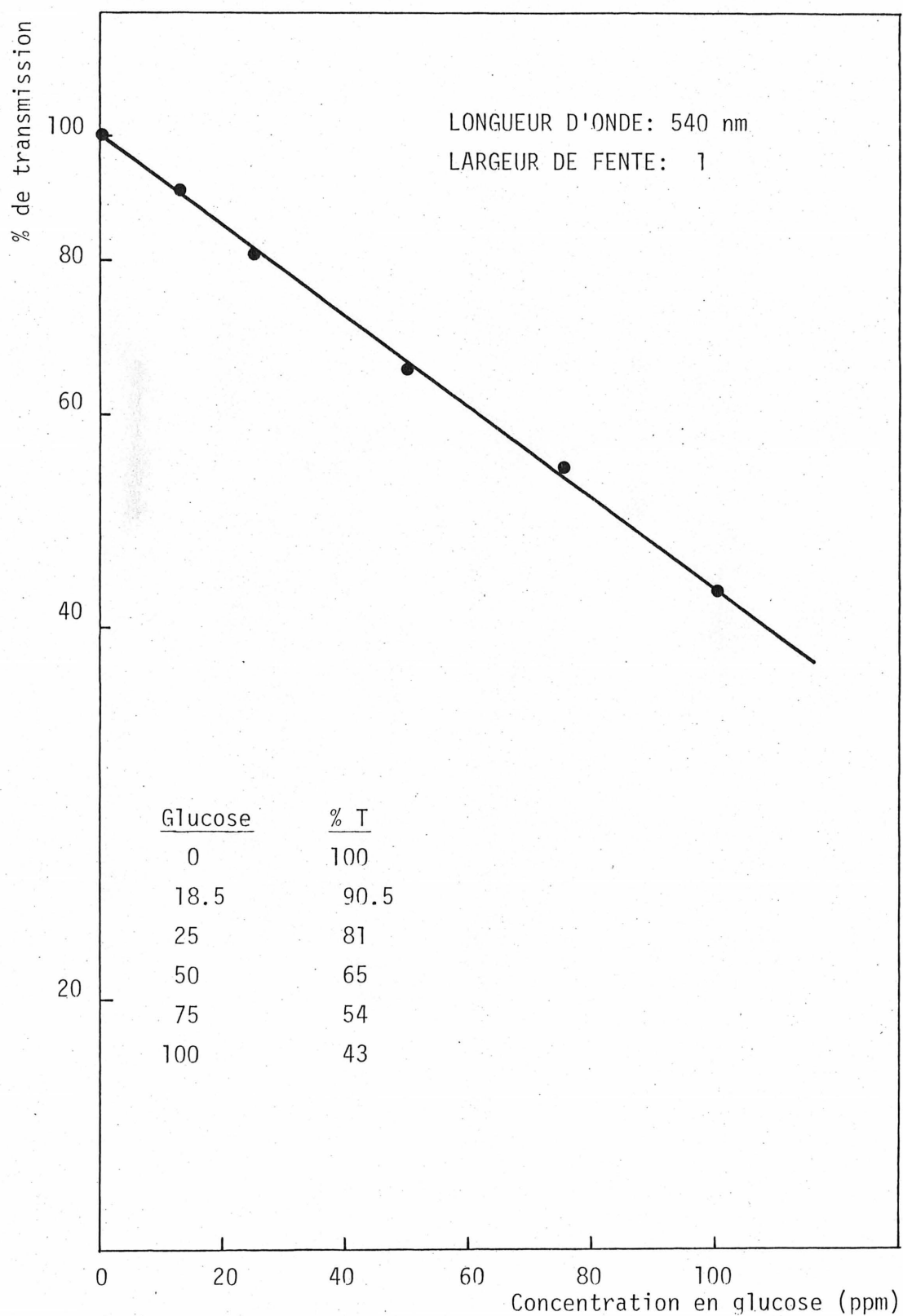


FIGURE 2: COURBE D'ETALONNAGE DU DOSAGE DES SUCRES

2.2.4 Calculs.

Une courbe d'étalonnage est préparée en reportant le logarithme du pourcentage de transmission en fonction de la concentration en glucose.

Le calcul est effectué en utilisant l'équation de la droite déduite de la figure 2:

$$\text{Concentration en glucose (ppm)} = 272.8 \log \frac{100}{\text{transmission}}$$

2.3 Mesure du pH.

Le pH des échantillons de fermentation est mesuré à 25°C sur l'échelle sensible d'un pH mètre (Fisher, modèle 320). L'expérience nous a montré que la présence de la biomasse n'affectait pas la précision de la mesure du pH. Celui-ci sera donc mesuré sans filtration du milieu de fermentation.

CHAPITRE 3

TRAITEMENT DE LA TOURBE ET OBTENTION DE L'EXTRAIT

3.1 Introduction.

Le traitement de la tourbe consiste essentiellement en une hydrolyse du matériel cellulosique de la tourbe. Cette hydrolyse est généralement effectuée par la chaleur, avec addition d'acides minéraux comme catalyseur.

L'étude consiste à rechercher les conditions optimales d'extraction des sucres de la tourbe. Après analyse du processus, nous avons retenu comme variables à étudier: la température et la pression, le temps de contact, l'humidité de la tourbe et la concentration en acide.

L'objectif est d'obtenir un rendement maximum d'hydrolysats avec une concentration en carbohydrates suffisante pour permettre une bonne croissance de Candida utilis.

3.2 Méthodologie expérimentale.

3.2.1 Appareillage utilisé.

Les différents essais sont effectués dans un autoclave en acier inoxydable pouvant supporter 150 psi de pression. Celle-ci est obtenue par l'utilisation de vapeur vive du réseau de l'université.

Il est à préciser que l'autoclave ne possède pas de système d'agitation.

3.2.2 Mode opératoire.

La tourbe utilisée pour cette étude est une tourbe de sphaigne blonde (sphagnum peat moss) provenant de la province de Québec à 100 milles au nord de la ville de Québec (Rivière Ouelle).

La tourbe est broyée et tamisée de façon à obtenir des particules dont la taille est comprise entre 4 et 60 mesh. La tourbe dont on dispose a une humidité de 60% (poids d'eau/poids de tourbe humide).

L'eau contenant de l'acide sulfurique est additionnée à la tourbe de façon à obtenir une concentration donnée d'acide par gramme de tourbe. Après mélange, un échantillon est prélevé de façon à effectuer une mesure de l'humidité nécessaire pour effectuer un bilan. L'humidité est calculée après avoir séché une quantité de tourbe humidifiée à 105°C pendant 24 heures.

La tourbe est placée dans un b cher de 3 litres pour subir le traitement à l'autoclave. Celui-ci s'effectue de la manière suivante:

- afficher la pression nécessaire;
- purger l'autoclave de l'air qu'il contient avec de la vapeur vive;
- réguler ensuite la pression et la température aux valeurs affichées. Si l'autoclave est bien purgé, la pression correspond à la tension de vapeur de l'eau;

- a la fin du temps de contact choisi, décompresser lentement l'autoclave de façon à éviter toute ébullition dans le bécher.

Le bécher contenant la tourbe est ensuite refroidi à température ambiante. L'hydrolysate est recueilli par filtration sur Buchner. Du papier Whatman no. 1 est utilisé pour la filtration; celle-ci est rendue difficile pour deux raisons: la tourbe traitée colmate les pores et la liqueur recueillie mousse de façon considérable.

Le volume de l'hydrolysate et le dosage des sucres sont réalisés sur la liqueur obtenue (voir méthodes analytiques). Avec l'humidité de la tourbe effectuée avant le traitement, il devient impossible de calculer le rendement d'extraction des sucres.

3.3 Résultats expérimentaux - Discussion.

Pour une concentration en tourbe constante et un couple de température et de pression donné, nous avons effectué quatre hydrolyses (H1, H2, H3, H4) dans le but de confirmer l'effet catalytique de l'acide constaté par différents auteurs (5,16). Les résultats des quatre essais sont présentés dans le tableau 6.

Nous constatons en premier lieu que l'action de l'acide se révèle très importante. Le rendement est en effet multiplié par 4.8 pour un temps de contact de 1 heure et par 2.7 pour 4 heures lorsque l'on utilise de l'acide.

TABLEAU 6

EFFET CATALYSEUR DE L'ACIDE SULFURIQUE
SUR LA REACTION D'HYDROLYSE DE LA TOURBE

N ^o	T (°C)	P (psig)	TEMPS (h)	% TOURBE*	% H ₂ SO ₄ **	CONCENTRATION EN SUCRES (g/l)	RENDEMENT*** EXPERIMENTAL
H1	121	15	1	4.4	0	1.8	20.6
H2	121	15	1	4.7	0.3	6.3	100.5
H3	121	15	4	4.4	0	5.6	90.5
H4	121	15	4	4.7	0.3	14.2	242.3

* gramme de tourbe sèche/100 g de solution

** ml d'acide sulfurique/100 g de solution

*** mg de sucre/g de tourbe sèche tenant compte de l'évaporation d'eau dans l'autoclave

Mais l'augmentation du temps de contact n'accroît pas le rendement de la même façon. Au contraire, l'accroissement est réduit. Ceci peut s'expliquer par la présence d'une deuxième réaction; une réaction de destruction des sucres (voir section 1.2).

Dans une seconde série d'expériences, pour différents temps de contact nous avons fait varier la température; de ce fait, la pression varie elle aussi et est égale à la tension de vapeur de l'eau à la température envisagée. Les concentrations en tourbe et en acide sulfurique demeurent constantes. L'étude de la température est réalisée pour des temps de contact de 0.3, 1, 2 et 4 heures. Les résultats sont présentés dans le tableau 7 et la figure 3. Un temps de contact de 0.3 heures est nettement insuffisant; mais, pour les autres temps de contact, les courbes du rendement en fonction de la température passent par un maximum. Ceci confirme nettement la réaction de destruction des carbohydrates.

Le meilleur rendement est obtenu pour 1 heure à 150°C. Si l'on trace le rendement maximum en fonction du temps de contact, tel qu'illustré à la figure 4, une diminution du rendement est en effet notée pour des temps de contact inférieurs et supérieurs à une heure.

Dans une troisième série d'hydrolyses, nous avons envisagé d'étudier l'effet de la concentration en tourbe tout en gardant un rapport tourbe/acide constant. Les résultats obtenus sont compilés dans le tableau 8. La figure 5 illustre le tracé du rendement et de la concentration en sucre dans la liqueur recueillie en fonction de la concentration en tourbe. Nous constatons que le rendement

TABLEAU 7

ETUDE DU TEMPS DE CONTACT ET DE LA TEMPERATURE

ESSAI	T (°C)	P (psig)	TEMPS (h)	% TOURBE*	% H ₂ SO ₄ **	CONCENTRATION EN SUCRE (g/l)	RENDEMENT*** EXPERIMENTAL
H5	158	70	1	4.1	0.3	12.9	280.0
H6	148	50	1	4.2	0.3	8.0	199.0
H7	173	100	1	3.9	0.3	8.2	197.0
H8	132	27	4	4.3	0.3	14.0	244.1
H9	148	50	4	3.9	0.3	9.0	224.0
H10	158	70	4	3.4	0.3	6.3	194.5
H11	121	15	2	3.4	0.3	6.8	194.0
H12	132	27	2	3.55	0.3	9.3	253.0
H13	148	50	2	4.1	0.3	8.3	215.5
H14	158	70	2	3.45	0.3	7.8	239.0
H15	173	100	2	3.3	0.3	6.6	200.0
H16	130	25	0.3	3.65	0.3	1.0	25.8
H17	148	50	0.3	3.8	0.3	2.2	54.2
H18	160	75	0.3	3.3	0.3	2.5	73.5
H19	173	100	0.3	3.3	0.3	2.6	76.9

* g de tourbe sèche/100 g de solution

** ml d'acide sulfurique/100 g de solution

*** mg de sucre/g de tourbe sèche tenant compte de l'évaporation d'eau dans l'autoclave

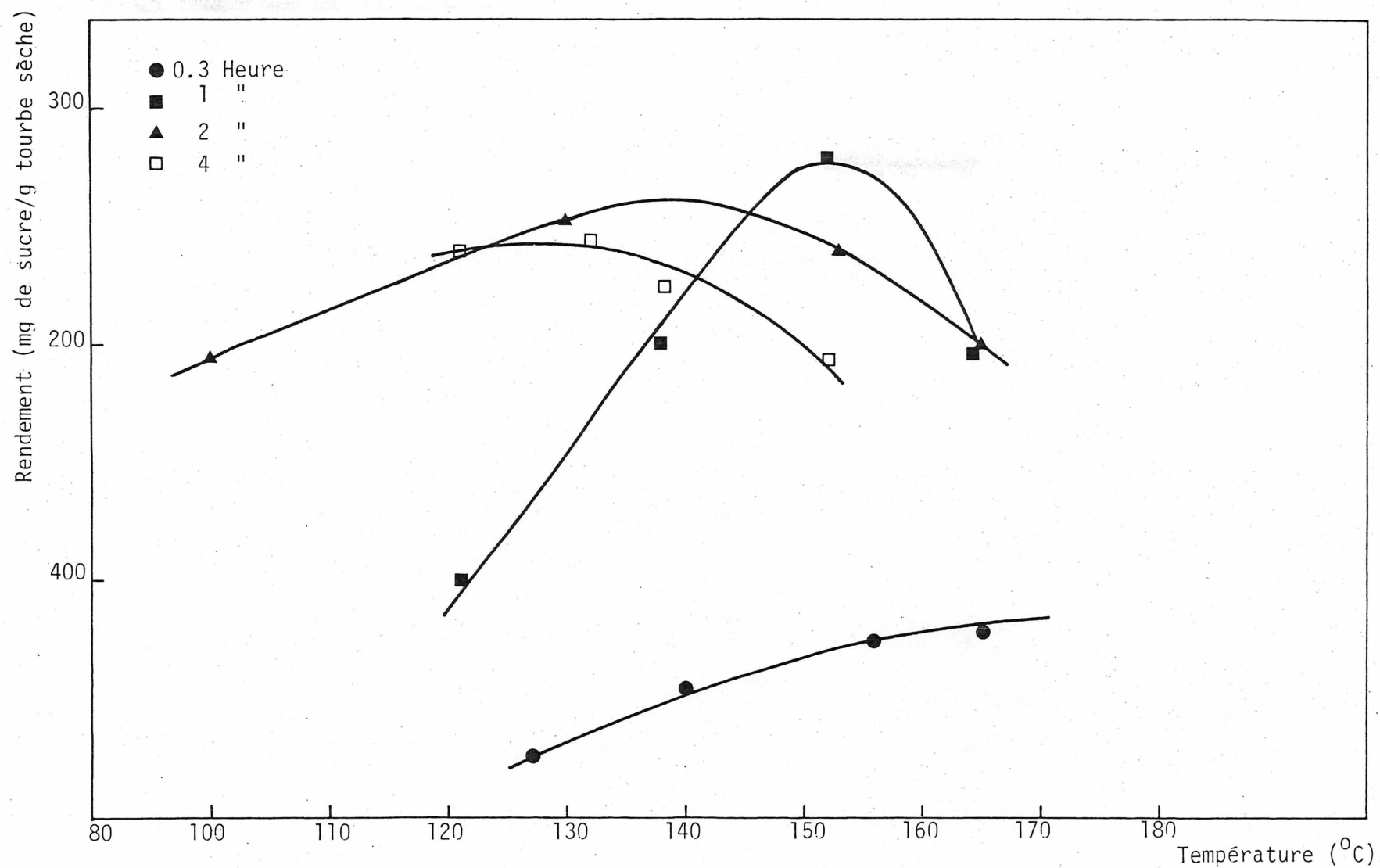


FIGURE 3: RENDEMENT EN SUCRES EN FONCTION DE LA TEMPERATURE POUR PLUSIEURS TEMPS DE SEJOUR.

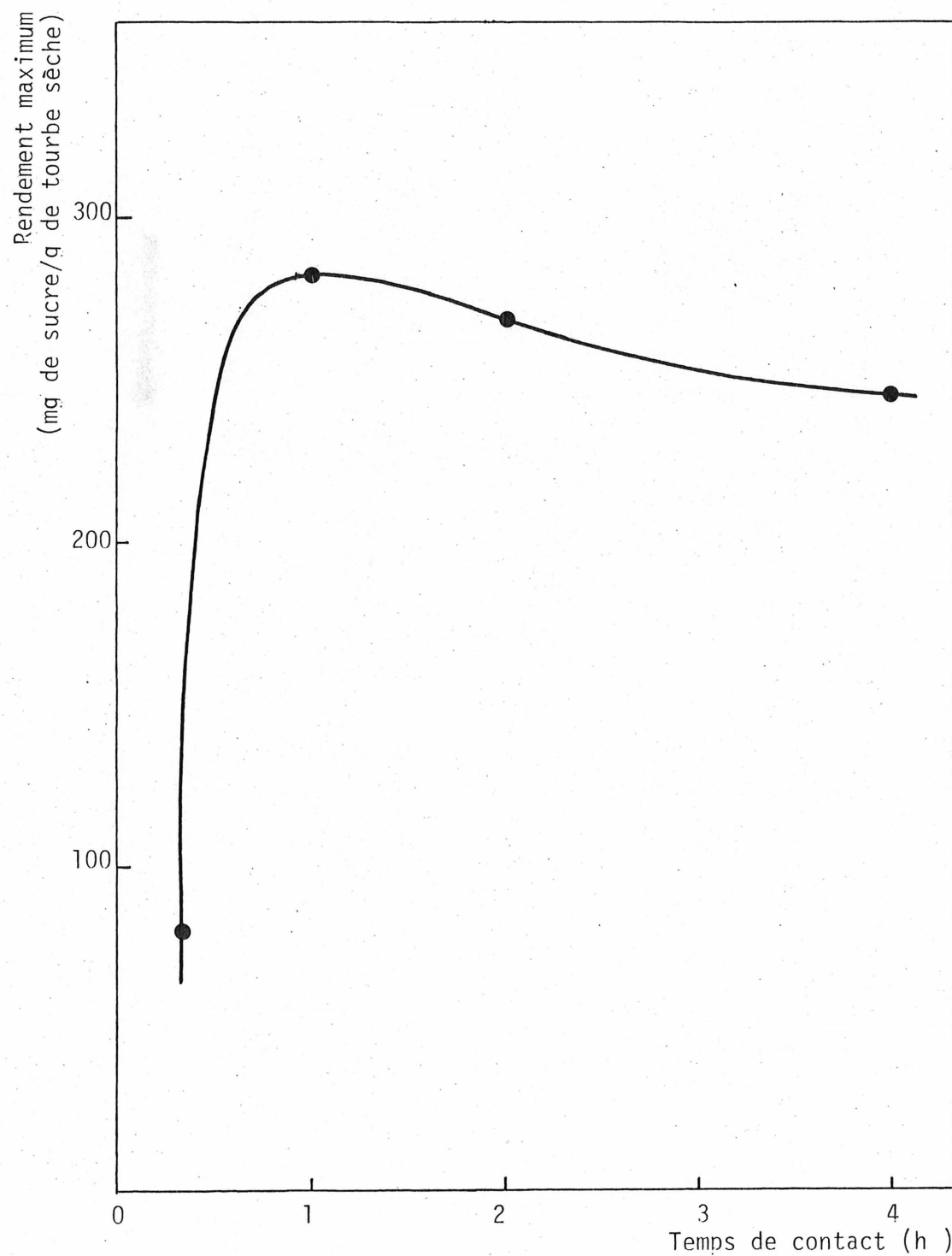


FIGURE 4: VARIATION DU RENDEMENT MAXIMUM EN FONCTION DU TEMPS DE CONTACT

TABLEAU 8

ETUDE DE LA CONCENTRATION EN TOURBE

N°	T (°C)	P (psig)	TEMPS (h)	% TOURBE*	% H ₂ SO ₄ **	CONCENTRATION EN SUCRE (g/l)	RENDEMENT*** EXPERIMENTAL
H 1	158	70	1	4.1	0.3	12.9	280
H 20	158	70	1	6.7	0.4	14	228
H 21	158	70	1	8.6	0.6	17.8	150
H 22	158	70	1	10.6	0.75	19.4	133

* g de tourbe sèche/100 g de solution

** mL d'acide sulfurique/100 g de solution

*** mg de sucre/g de tourbe sèche tenant compte de l'évaporation d'eau dans l'autoclave

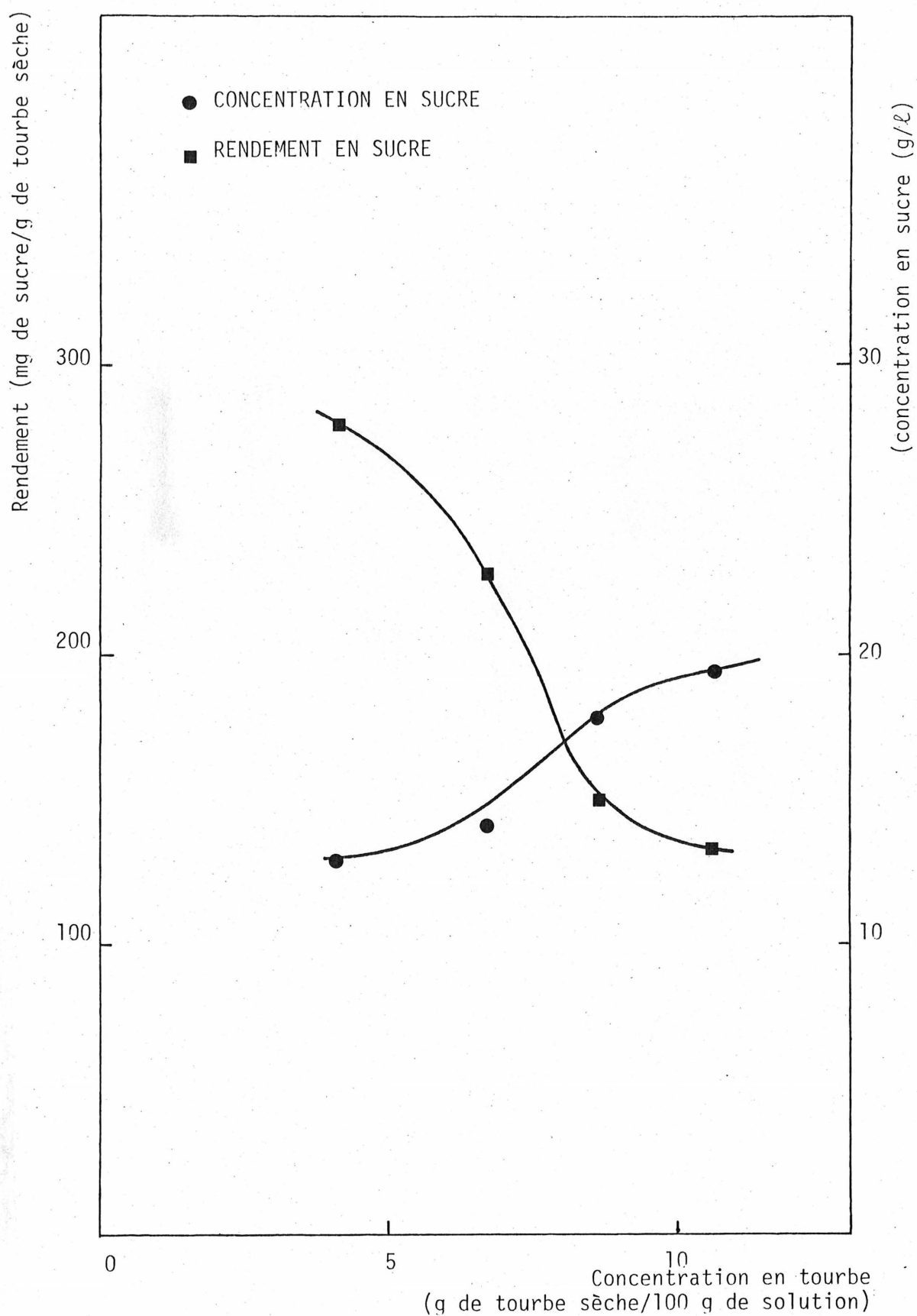


FIGURE 5: VARIATION DU RENDEMENT ET DE LA CONCENTRATION EN SUCRES EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN TOURBE

en sucre diminue avec la concentration en tourbe; d'autre part, nous observons une augmentation en sucre dans le filtrat en fonction de la concentration. Lors de ces cuissons, nous avons remarqué que la tourbe se trouvant au centre du bécher garde sa structure originale alors qu'à la périphérie, la tourbe était réduite en pâte. Ceci s'explique par le fait que nous avons un gradient de température dans notre bécher. Le centre de celui-ci étant évidemment moins soumis à l'hydrolyse, la tourbe n'est pas hydrolysée de façon homogène. D'autre part, plus on augmente la concentration, plus ce phénomène se fait sentir, le transfert de la chaleur devient de plus en plus difficile. Cet inconvénient peut être réduit par l'utilisation d'un autoclave muni d'un dispositif d'agitation. Ceci permettrait de réaliser de meilleurs rendements en obtenant des concentrations très intéressantes. De plus, la montée en température s'effectuerait plus rapidement et permettrait de diminuer le temps de contact.

Dans notre cas, ne disposant que d'un autoclave sans dispositif d'agitation, nous avons retenu comme conditions d'extraction 150°C et 1 heure de temps de contact. Nous obtenons un rendement maximum de 28%. Celui-ci est comparable à celui obtenu dans l'étude du Bureau des Mines ⁽⁵⁾ qui est de l'ordre de 20-21%; ce rendement dépend étroitement de l'état de décomposition de la tourbe employée. Dans notre cas, la tourbe a un degré d'humification bas, ce qui explique que nous obtenons un bon rendement en sucre.

3.4 Obtention d'un extrait en quantité importante.

Dans le but de disposer d'un milieu de composition chimique constant tout le long de l'étude de fermentation, nous avons envisagé de faire 200 litres d'hydrolysats que l'on entreposerait dans une chambre froide (4°C) après stérilisation afin de minimiser les risques de dégradation biologiques.

Nous avons réalisé ce projet en apportant quelques changements pour faciliter l'opération.

Les cuissons sont réalisées dans l'autoclave mais la tourbe est disposée dans un contenant rectangulaire en tôle galvanisée dont l'épaisseur est égale à celle du béccher pour retrouver des conditions de transfert à peu près identiques à celles des essais. Après le traitement thermique, la tourbe est pressée pour en retirer l'hydrolysats. Une dernière opération de filtration est effectuée avant le stockage de celui-ci dans la chambre froide.

Le filtrat obtenu (dont le pH est inférieur à 1) doit être neutralisé pour obtenir un pH de 5, satisfaisant pour la croissance de Candida utilis. Ce changement de pH a entraîné une précipitation importante. Nous avons tout d'abord pensé à une précipitation de matières organiques. Mais, une analyse du carbone total en solution avant et après filtration des matières en suspension nous a permis de conclure que le précipité était de nature inorganique.

L'utilisation de bases différentes n'a pas modifié le problème. Beaucoup d'essais ont été tentés pour enlever celui-ci mais sans succès.

L'analyse par spectrophotométrie de flamme des métaux en solution nous a révélé une teneur en fer de 3400 ppm; ceci nous a permis de montrer que le précipité obtenu était composé en majorité d'hydroxydes ferreux.

L'analyse du fer dans la tourbe révélant de faibles quantités nous a permis de conclure que celui-ci provenait de la corrosion du contenant métallique mais aussi de la presse utilisée.

L'utilisation d'un contenant en acier inoxydable nous donne encore 600 ppm de fer alors que l'utilisation de béciers en verre réduit la concentration en fer à des valeurs inférieures à 50 ppm.

Les conditions dans lesquelles nous avons refait le traitement sont les suivantes:

- la tourbe à 40% d'humidité est mélangée à l'eau acidulée (1.5% V/V d'acide sulfurique) dans des proportions de 200 g de tourbe pour 600 mL d'eau acidulée;
- l'hydrolyse, à 150°C et 70 psi pendant 1 heure, s'effectue dans des béciers en verre et non dans un contenant métallique;
- la récupération de l'hydrolysate s'effectue par filtration sur Buchner pour éviter toute contamination par du fer.

Nous avons ainsi obtenu 100 litres d'hydrolysate dont la teneur en fer est inférieure à 50 ppm (48 ppm).

CHAPITRE 4

METHODOLOGIE DES FERMENTATIONS

4.1 Conservation de la souche et inoculation des fermentations.

La souche de Candida utilis dont nous disposons provient de la collection du professeur Zajic de l'université de Western Ontario .

La souche pure est conservée dans des tubes d'agar nutritif entreposés au réfrigérateur (4°C).

La souche a été acclimatée à l'hydrolysate de tourbe par plusieurs incubations successives effectuées de la manière suivante: L'hydrolysate de tourbe est filtré sur filtre gelman 45 µ pour ensuite être ajusté à pH 5 avec de l'ammoniaque. Deux cents millilitres de milieu, ainsi préparés, sont alors stérilisés (à 121°C et 15 psig pendant 1 heure) dans un erlenmeyer de 500 mL. La première inoculation est effectuée par transplantation de la souche à partir des cultures sur milieu solide (agar nutritif). Par la suite, l'inoculation est faite en pipettant 10 mL stérilement pour l'ajouter à 200 mL de milieu. L'erlenmeyer est ainsi mis à incuber à 30°C à 200 rpm pendant plusieurs jours.

La souche, ainsi acclimatée, est conservée dans les erlenmeyers au réfrigérateur.

L'inoculation des fermentations se fera en suivant les recommandations de Luedeking ⁽¹⁵⁾:

- utilisée un inoculum dans la phase exponentielle;

- utiliser pour l'innoculum un milieu de la même composition que celui utilisé dans le fermenteur;
- utiliser un innoculum relativement important, environ 5% du volume à ensemençer.

Ainsi l'innoculation des fermentations se fera à partir d'un erlenmeyer incubé trois jours (on est ainsi dans la phase exponentielle comme nous le verrons par la suite). Le contenu des erlenmeyers est transféré aseptiquement dans les erlenmeyers ou dans le fermenteur pour donner approximativement 5% (V/V).

L'absence de contamination de chaque innoculum est vérifiée au microscopie et confirmée par des boîtes de pétri (agar nutritif à pH 7). En effet l'examen microscopique est rendu difficile par un léger précipité présent dans le milieu de culture.

4.2 Description du système de fermentation.

Le fermenteur, schématisé à la figure 6 est constitué d'un corps en verre et de deux couvercles en acier inoxydable. Huit connexions standards sont placées sur le couvercle pour permettre l'introduction de manière stérile, des instruments de mesure de température, de pH, ainsi que des aiguilles pour l'aération, l'échantillonnage, et l'alimentation. Le fermenteur a un volume de sept litres et l'entraînement de l'agitateur est effectué par un moteur à courant continu à vitesse variable (0-3000 rpm). Le système d'agitation est constitué de trois disques à quatre pales et de quatre chicanes,

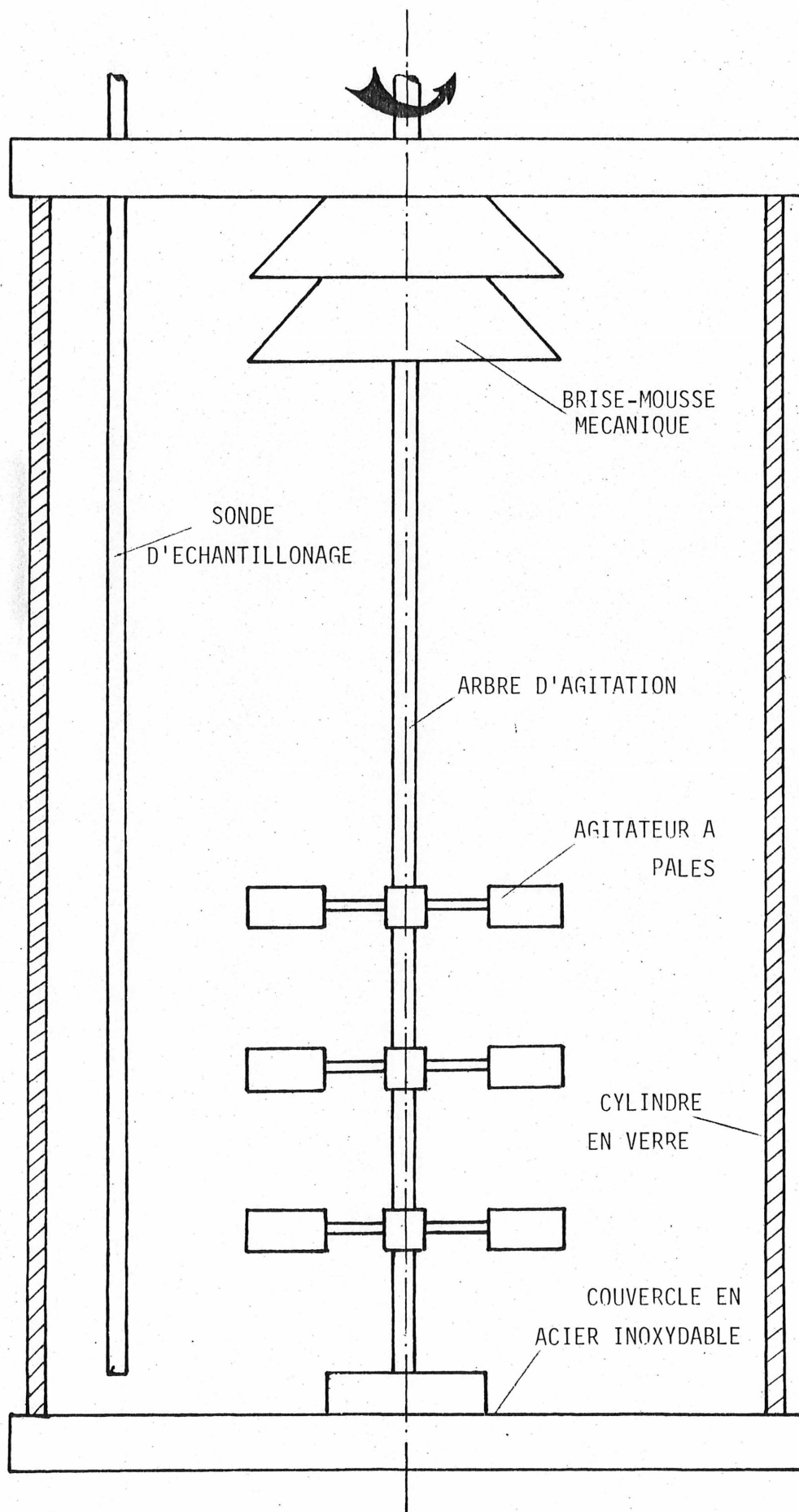


FIGURE 6: SCHEMA SIMPLIFIE DU FERMENTEUR

lesquelles servent à prévenir une rotation complète du liquide.

L'air qui passe à travers un filtre de laine de verre, est dispersé dans le milieu par une couronne, percée de trous, située à la partie inférieure du fermenteur. Le débit est contrôlé par un débitmètre Brooks dont la courbe de calibration est fournie par le constructeur (figure 7). Le réglage de la température est effectué par une circulation d'eau dans le système d'agitation. L'eau de refroidissement ou de chauffage est contrôlée et régulée électriquement par un thermomètre à contact. La précision maximum est obtenue à un débit d'eau optimum qui dépend de la vitesse d'agitation, du poids de consigne et du degré d'exothermicité (voir figure 8).

Le pH est régulé automatiquement par un système de deux pompes péristaltiques (P1, P2), l'une pour l'acide (HCl 0.1N), l'autre pour la base (NaOH 0.1N). Le système d'alimentation en acide-base est détaillé sur la figure 9. Si la qualité de régulation est bonne, la mesure de la quantité de base versée, pour maintenir le pH constant, peut permettre de suivre la croissance. Ceci est réalisé par l'intermédiaire d'une burette dont le niveau est ajusté par syphonage.

Le fermenteur dispose, en outre, d'un brise mousse mécanique; mais celui-ci n'opère qu'à partir d'une vitesse de rotation de 800 rpm. De ce fait le contrôle de la mousse est effectué par l'injection d'antimousses, agents chimiques antimoussants, dilués comme conseillé par le fabricant est injecté de façon intermittente à l'aide d'une pompe péristaltique. Le contrôle de la mousse et l'addition de l'antimousse sont faits manuellement.

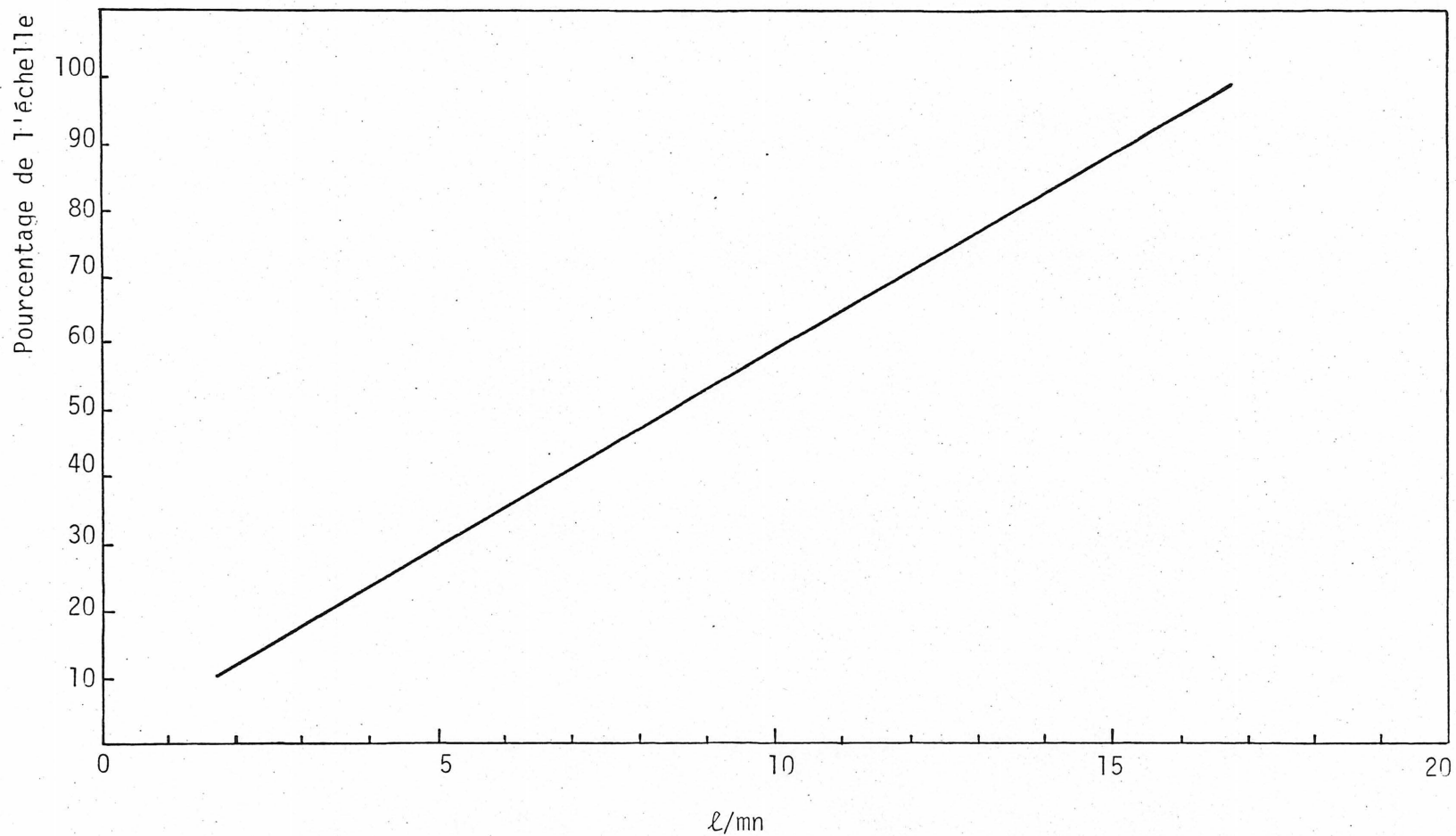


FIGURE 7: COURBE D'ETALONNAGE DU DEBITMETRE

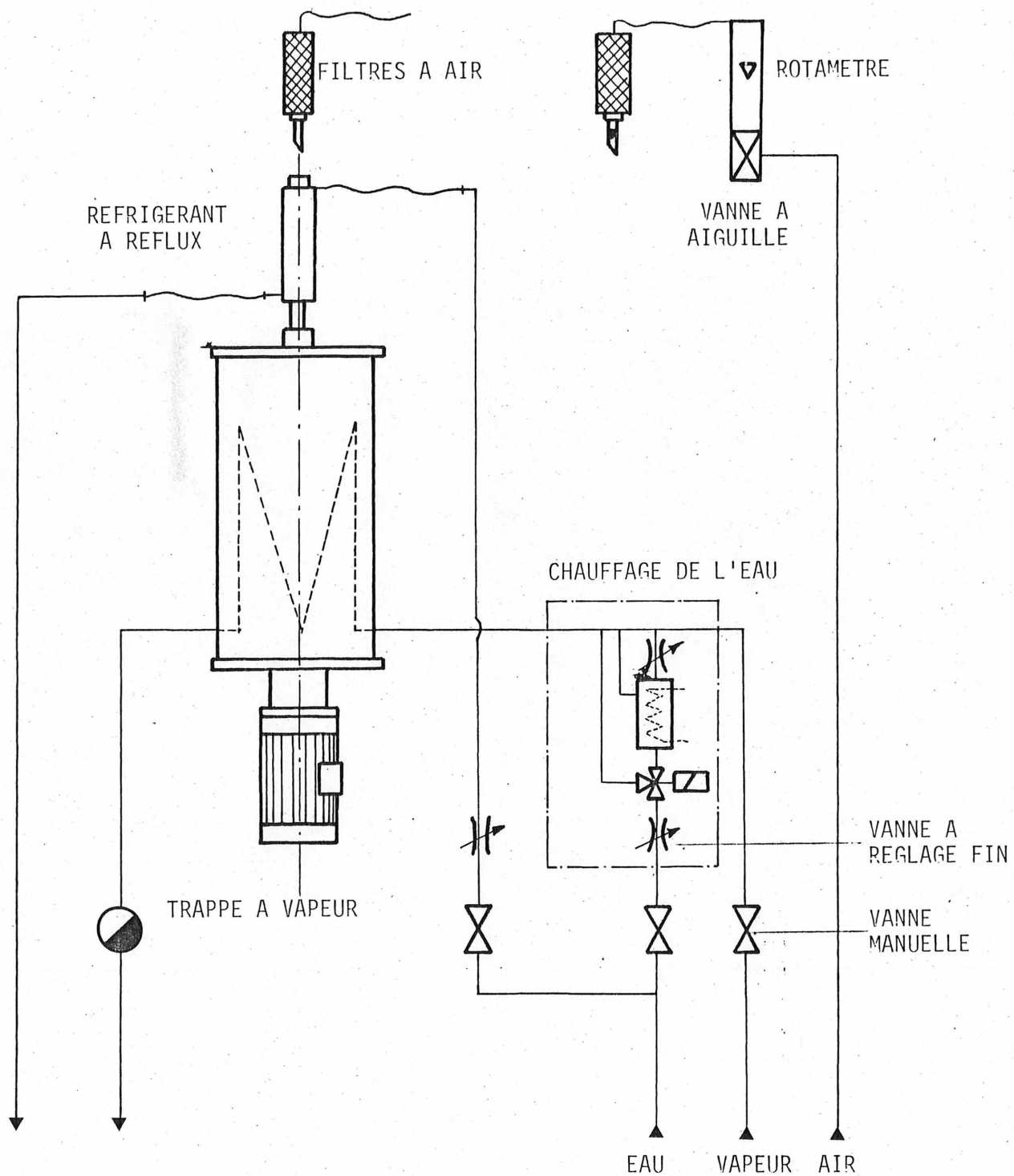


FIGURE 8: SCHEMA D'INSTALLATION DU FERMENTEUR

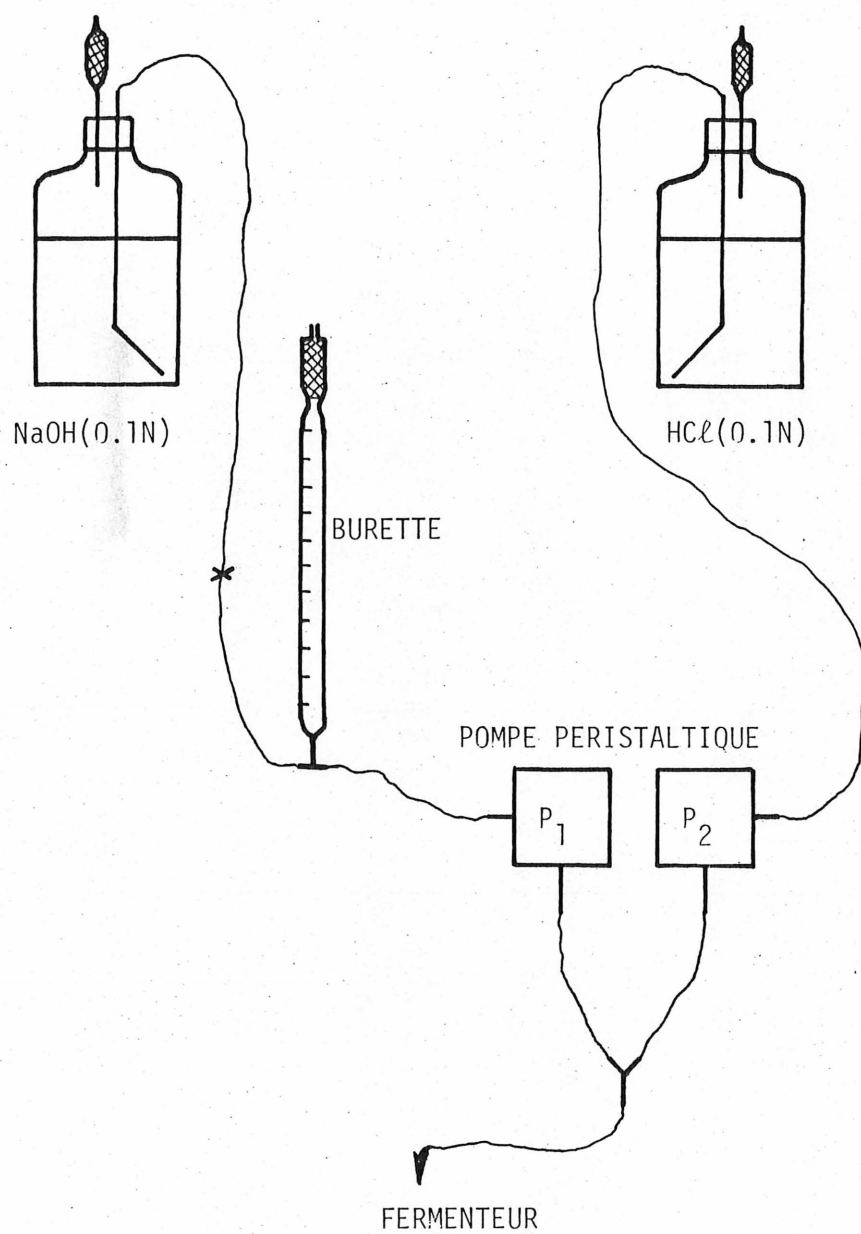


FIGURE 9: SCHEMA DE L'ALIMENTATION EN ACIDE BASE

4.3 Opération du fermenteur en discontinu.

Le fermenteur est rempli avec 5 ℓ de milieu ajusté à pH 5. La stérilisation du fermenteur peut s'effectuer de deux manières différentes soit sur place en glissant le tube de protection en acier inoxydable sur le fermenteur et en injectant de la vapeur directement dans le système d'agitation, soit en autoclave; le fermenteur se démontant facilement. Les éléments annexes sont stérilisés séparément dans l'autoclave à 121°C et 15 psig pendant 20 minutes. Dans notre cas nous avons effectué la stérilisation sur place en maintenant le fermenteur à 121°C et 15 psi pendant 30 minutes. L'agitation est alors de 500 rpm.

La stérilisation finie, les opérations suivantes sont effectuées dans l'ordre:

- insertion du filtre à air de sortie à 48°C ;
- après enlèvement du tube de protection, connexion du réfrigérateur à reflux;
- à 45°C , installation du thermomètre à contact et affichage du point de consigne. Le débit de l'eau de refroidissement (10.5°C) est ajusté de façon à obtenir une bonne régulation;
- connexion du filtre d'air d'entrée et ajustement du débit d'air (25% - 4.2 ℓ/mn).
- connexion du système d'alimentation en acide base et ajustement du pH à 5;
- installation de toutes les autres connexions et ajustement de la vitesse de rotation à 500 rpm.

Le fermenteur est ainsi prêt à l'innoculation. Celle-ci est effectuée comme décrite précédemment (section 4.1). Le prélèvement n'est fait que quelques minutes après l'ensemencement pour permettre au système de s'homogénéiser. Nous allons à présent suivre l'évolution de la culture en mesurant les paramètres suivants:

- biomasse par poids sec;
- substrat résiduel par dosage des sucres totaux;
- consommation de soude 0.1 N.

4.4 Opération du fermenteur en continu.

4.4.1 Equipement du fermenteur.

Au fermenteur décrit précédemment, nous avons ajouté un dispositif pour effectuer une culture en continu.

Le milieu frais et additionné de façon stérile par l'intermédiaire d'une pompe péristaltique (Polystaltic Pump - BUCHLER Instruments). La pompe a un débit qui peut aller de 40 à 1000 ml/h lorsque du tube de tygon (3/32" DI x 1/32" épaisseur) est utilisé. Une courbe d'éta-lonnage a été réalisée (figure 10). Cependant, celle-ci ne donne qu'un ordre de grandeur du débit car le tube se déforme de façon dif-férente suivant la manière dont il est placé. Un système pour déter-miner et contrôler le débit d'alimentation en continu a été réalisé (voir figure 11). La burette est remplie de milieu provenant du ré-servoir, lequel est alors fermé; le temps nécessaire pour pomper un volume de milieu donné est mesuré; on peut ainsi calculer le débit;

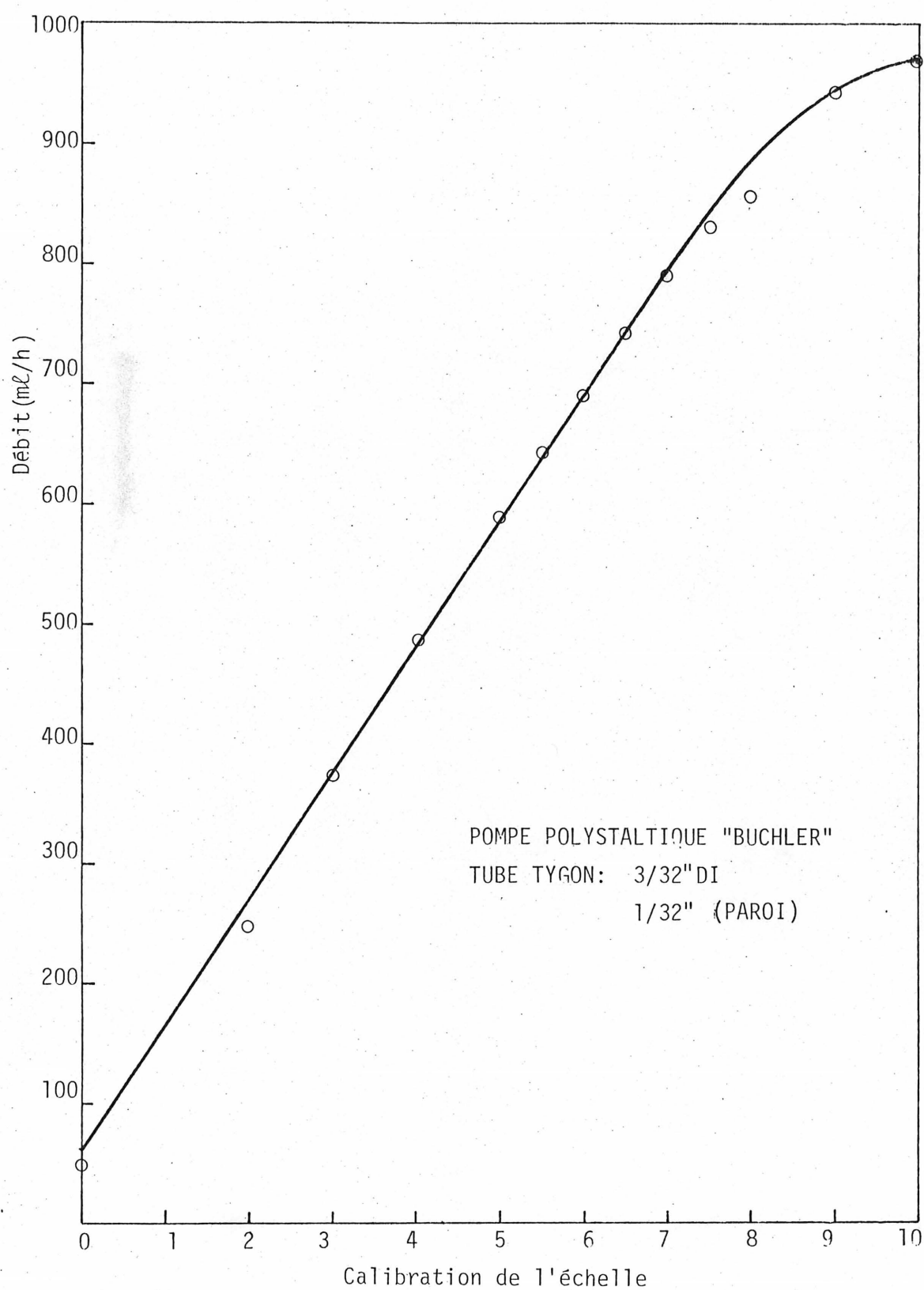


FIGURE 10: COURBE D'ETALONNAGE DE LA POMPE

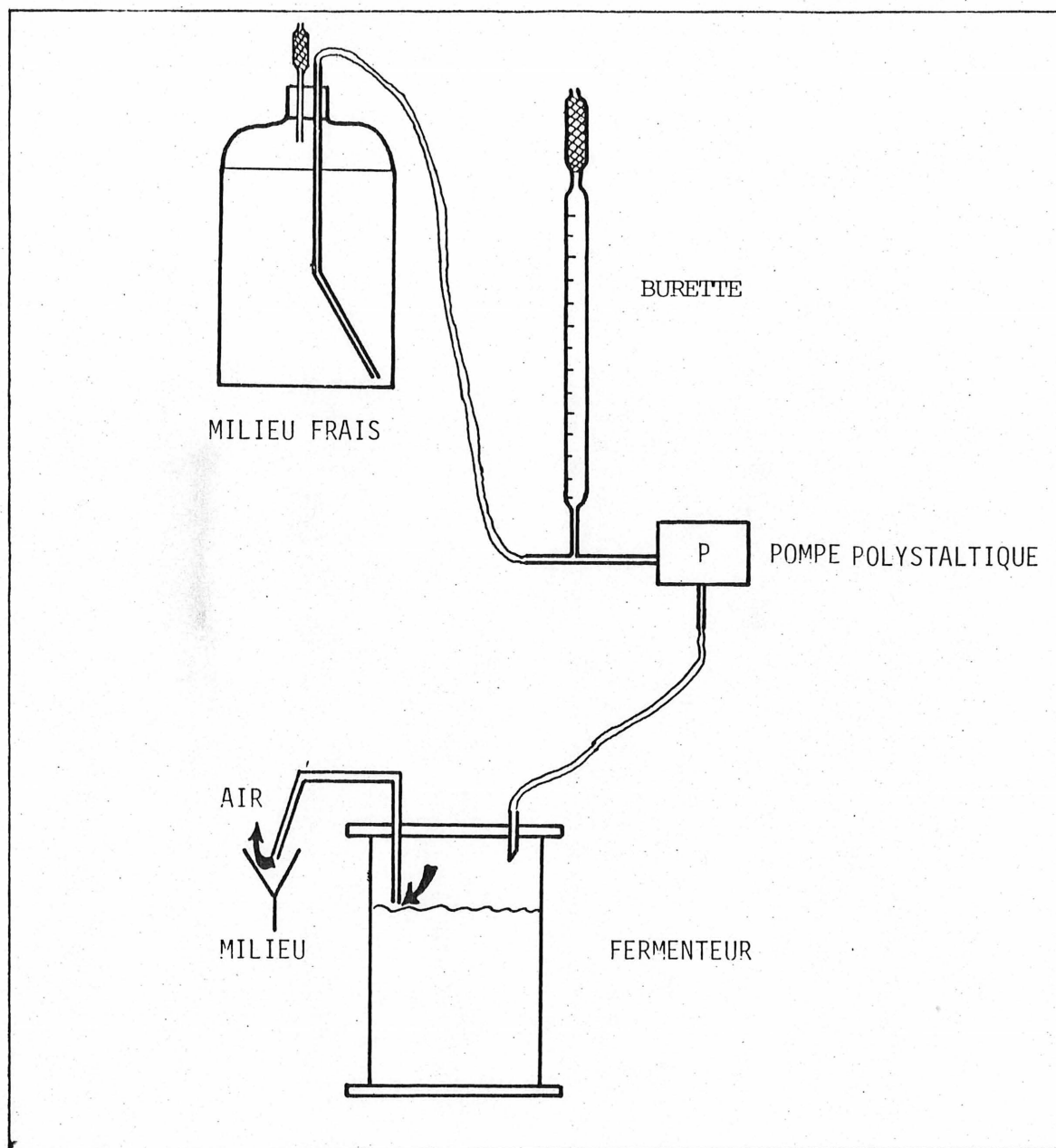


FIGURE 11: ALIMENTATION DU FERMENTEUR EN CONTINU

avec ce système le débit d'alimentation n'est pas interrompu.

Le maintien d'un volume constant est essentiel tout au long de la culture en continu. Ceci est réalisé par le dispositif de la figure 11. Le débit de sortie d'air est utilisé pour maintenir le niveau constant; si le niveau monte, la surpression créée par l'aération fera sortir le milieu en excès. Le système a donné de bons résultats; mais la mousse doit être soigneusement contrôlée.

Le milieu frais est bloqué dans des bouteilles de 20 l. La stérilisation des bouteilles est effectuée en laissant les bouteilles pendant deux heures à 121°C. En effet, le temps pour porter le centre de la bouteille à 121°C est beaucoup plus long. Le temps de deux heures est justifié par le travail de WILKINSON et BAKER⁽³²⁾. La figure qui suit (figure 12) montre les gradient de température dans la bouteille au cours de la stérilisation.

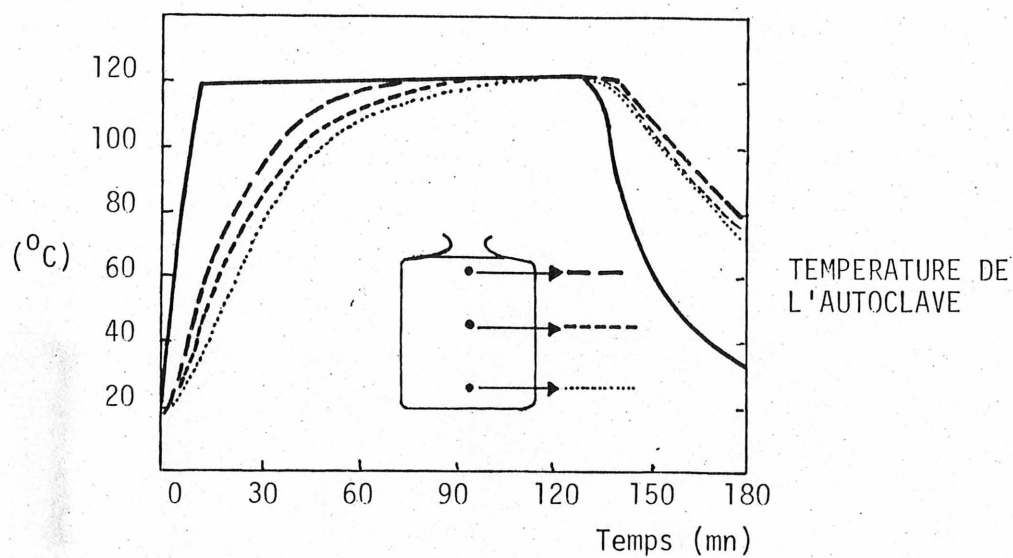


FIGURE 12: GRADIENT DE TEMPERATURE DANS UNE BOUTEILLE DE 20ℓ PENDANT LA STERILISATION

La vitesse de rotation ainsi que le débit d'air sont maintenus constants, une variation de l'un d'eux entraîne automatiquement une variation de volume.

Enfin la mesure de la biomasse et de la concentration en sucre résiduel est effectuée sur chaque échantillon prélevé.

CHAPITRE 5

FERMENTATION DISCONTINUE

5.1 Fermentation en erlenmeyer sur agitateur rotatif.

5.1.1 Introduction.

L'étude de la croissance en erlenmeyer a pour but de trouver les conditions optimales de croissance de Candida utilis. MAC LOUGHLIN et KUSTER⁽¹⁷⁾ ont montré dans leur étude les points suivants:

- la température optimale de croissance est 30°C;
- la gamme de pH pour obtenir une biomasse maximum est 4.5-5.5;
- la nécessité d'ajouter du phosphate.

Vu que les valeurs optimales de la température et du pH trouvées par MAC LOUGHLIN et KUSTER sont en accord avec celles mentionnées par d'autres auteurs^(3,14) nous avons pensé qu'il n'était pas nécessaire d'examiner à nouveau ces deux points. De ce fait les fermentations sur agitateur rotatif ont été réalisées dans les conditions suivantes:

- pH initial: 4.5 - 5;
- température: 30°C;
- vitesse de rotation 200 rpm.

5.1.2 Recherche des éléments nutritifs à additionner à l'hydrolysate.

Différents auteurs ⁽¹⁷⁾ ont montré la nécessité d'ajouter des sels de phosphates dans l'extrait de tourbe. JONHSON ⁽⁹⁾ préconise aussi un traitement au charbon actif pour enlever certaines substances inhibitrices.

L'analyse de différents éléments dans notre milieu a montré que plusieurs métaux, utilisés comme facteur de croissance, étaient présents dans l'hydrolysate (Fe, Ca, K, Na, Mg, Mn).

Aussi nous avons envisagé l'étude de l'addition de différents éléments nutritifs (N, P) ainsi que l'effet d'un traitement au charbon actif.

Nous avons d'abord examiné l'utilisation de plusieurs bases (NaOH , NH_4OH) afin d'amener le pH à la valeur désirée.

Celui-ci est ajusté à 5 soit avec de la soude 15N, soit avec de l'ammoniaque (28.30%) de façon à effectuer la même dilution dans les deux cas. L'intérêt d'utiliser de l'ammoniaque est qu'elle peut être éventuellement une source d'azote. De la comparaison des fermentations FE1 et FE2, on retiendra une des deux bases.

Ensuite le traitement au charbon actif est envisagé. Le charbon utilisé est le suivant: CARBON DECOLORIZING NEUTRAL NORIT (Fisher Scientific Co. Ltd.). Des essais montrent que pour obtenir une nette décoloration, le pH et la concentration en charbon doivent être respectueusement de 1 et 200 g/l. L'utilisation d'un pH très acide nécessite le lavage préalable du charbon

pour éviter de retrouver toutes les cendres de celui-ci en solution dans le milieu.

Une fermentation FE3 est alors effectuée sur l'hydrolysats ainsi traitée et neutralisée avec la base choisie précédemment. On décide alors de retenir ou de rejeter le traitement au charbon actif en comparant le résultat de FE3 au meilleur de FE1 et FE2.

Finalement, l'addition de sels de phosphates (K_2HPO_4) est envisagée (FE4).

Les résultats expérimentaux sont exprimés dans les figures 13, 14, 15, 16 et le tableau 9. On constate en examinant celui-ci :

- primo, que l'hydrolysats neutralisé avec l'ammoniaque donne une biomasse plus importante. En effet, FE1 (voir figure 13) donne une biomasse de 2.8 g/l contre 3.7 g/l pour FE2 (voir figure 14). L'addition d'azote augmente donc la biomasse de 32%;
- secundo, que le traitement au charbon actif n'augmente pas la croissance; au contraire celle-ci diminue de 40% par rapport à FE2; ceci est certainement dû au fait que le charbon actif absorbe probablement les sucres présents dans la liqueur;
- tertio, que l'addition de phosphate (5 g/l de K_2HPO_4) conduit à une nette augmentation de la biomasse FE4 (voir figure 16) nous donne une biomasse de 6.6 g/l. On a donc une augmentation de 135% par rapport à FE1. En comparant FE4 et FE2, on peut considérer que l'addition de phosphate augmente la biomasse de 78%.

TABLEAU 9

EFFET DE L'ADDITION D'ELEMENTS NUTRITIFS A L'HYDROLYSAT BRUT

FERMENTATION	BIOMASSE PRODUITE (g/l)	% VARIATION	PAR RAPPORT A LA FERMENTATION
FE1 (addition de soude)	2.8	-	-
FE2 (addition de NH_4OH)	3.7	32	FE1
FE3 (traité au charbon actif + NH_4OH)	1.7	-54	FE2
FE4 (phosphate + NH_4OH)	6.6	135	FE1

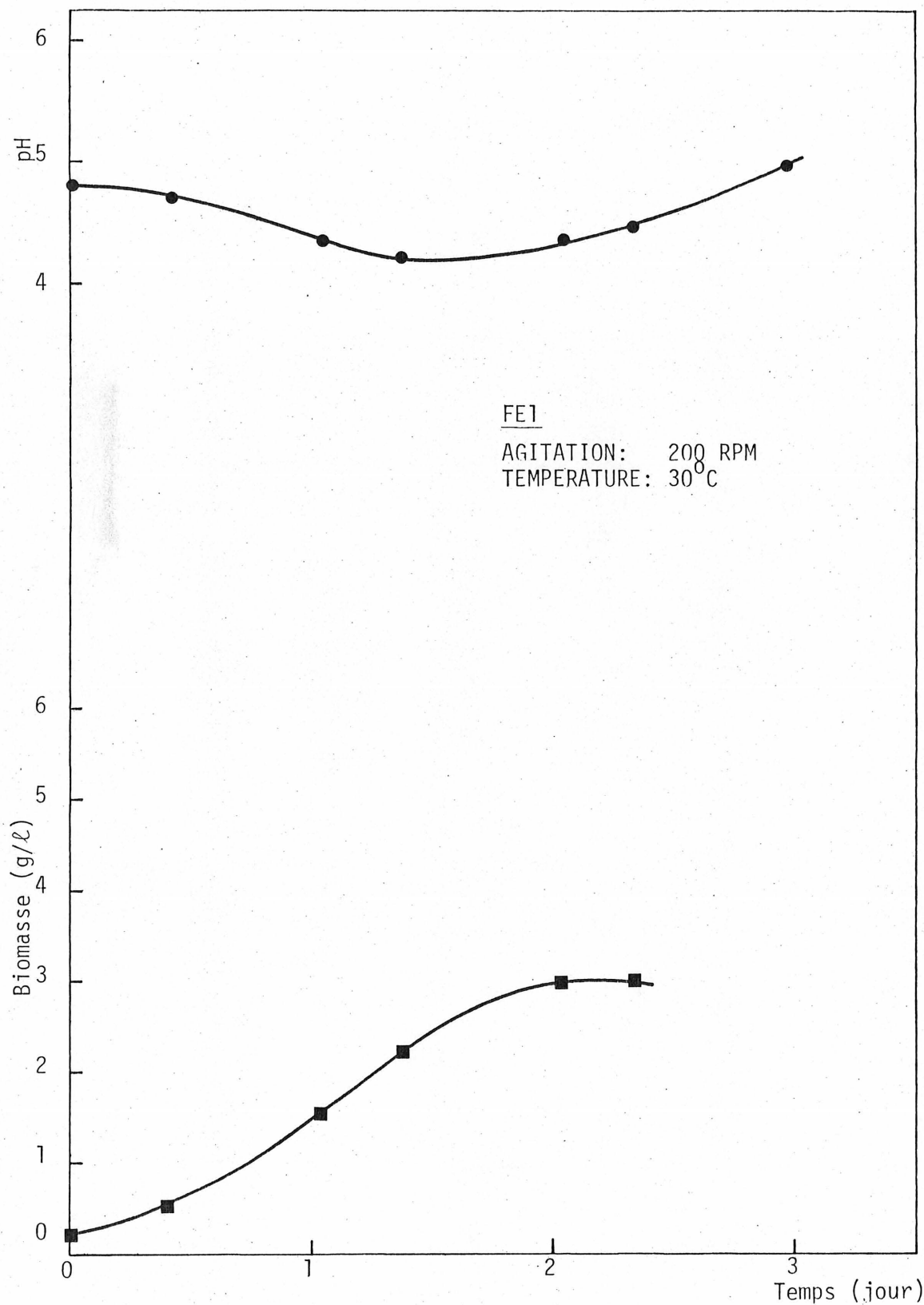


FIGURE 13: CROISSANCE DE C. UTILIS SUR HYDROLYSAT NEUTRALISE AVEC LA SOUDE

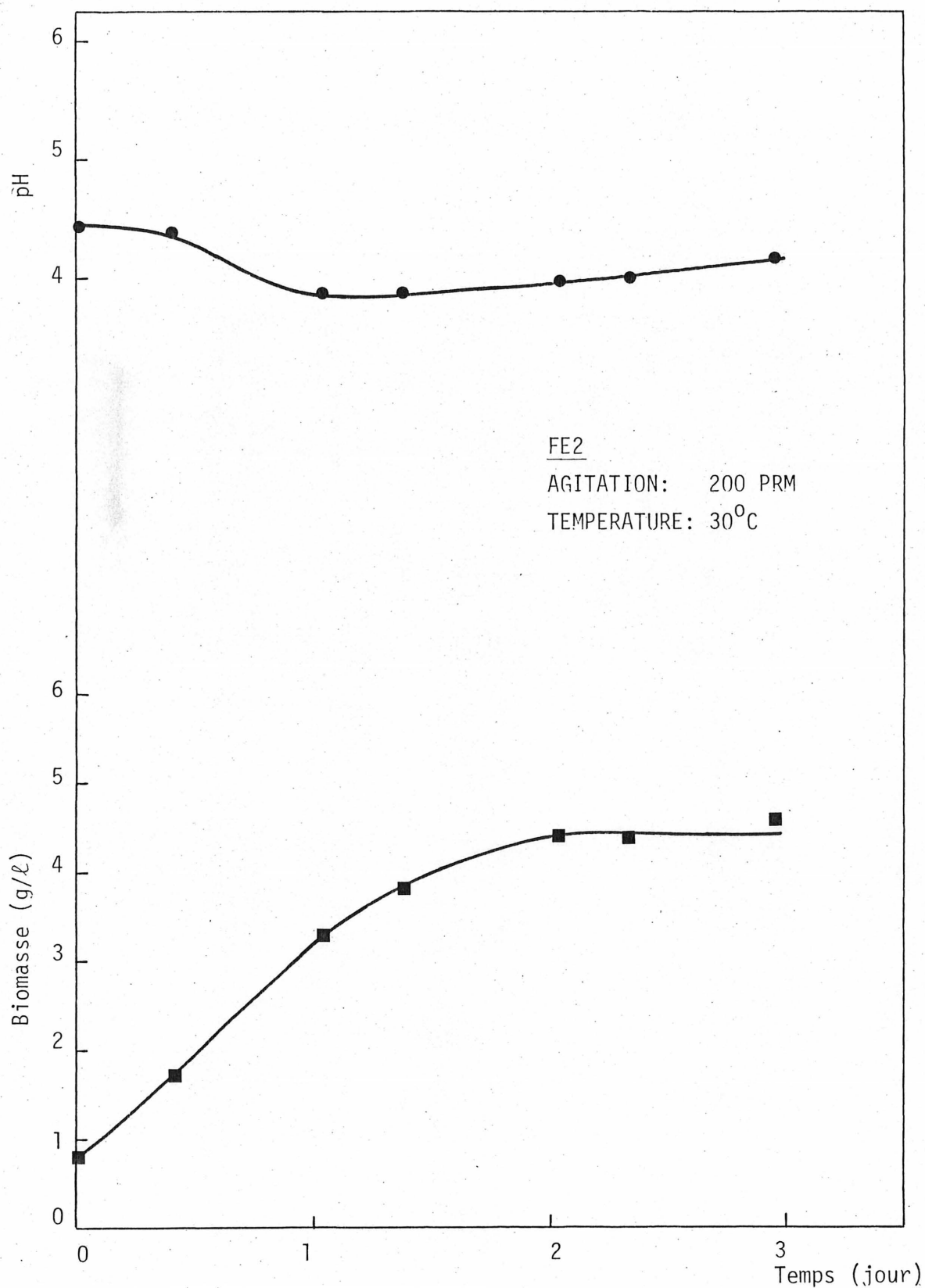


FIGURE 14: CROISSANCE DE C. UTILIS SUR HYDROLYSAT NEUTRALISE AVEC L'AMMONIAQUE

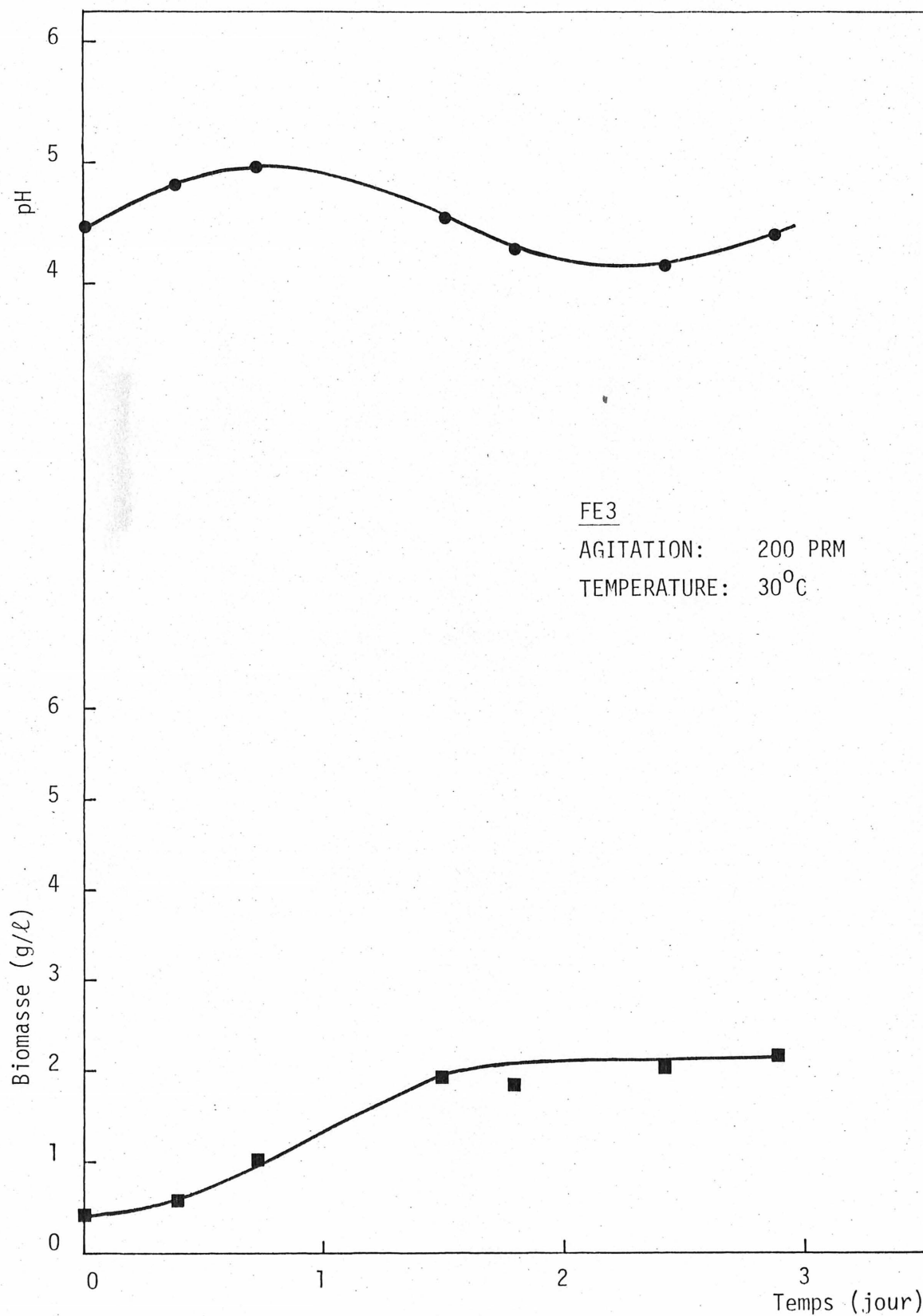


FIGURE 15: CROISSANCE DE C. UTILIS SUR HYDROLYSAT TRAITE AU CHARBON ACTIF

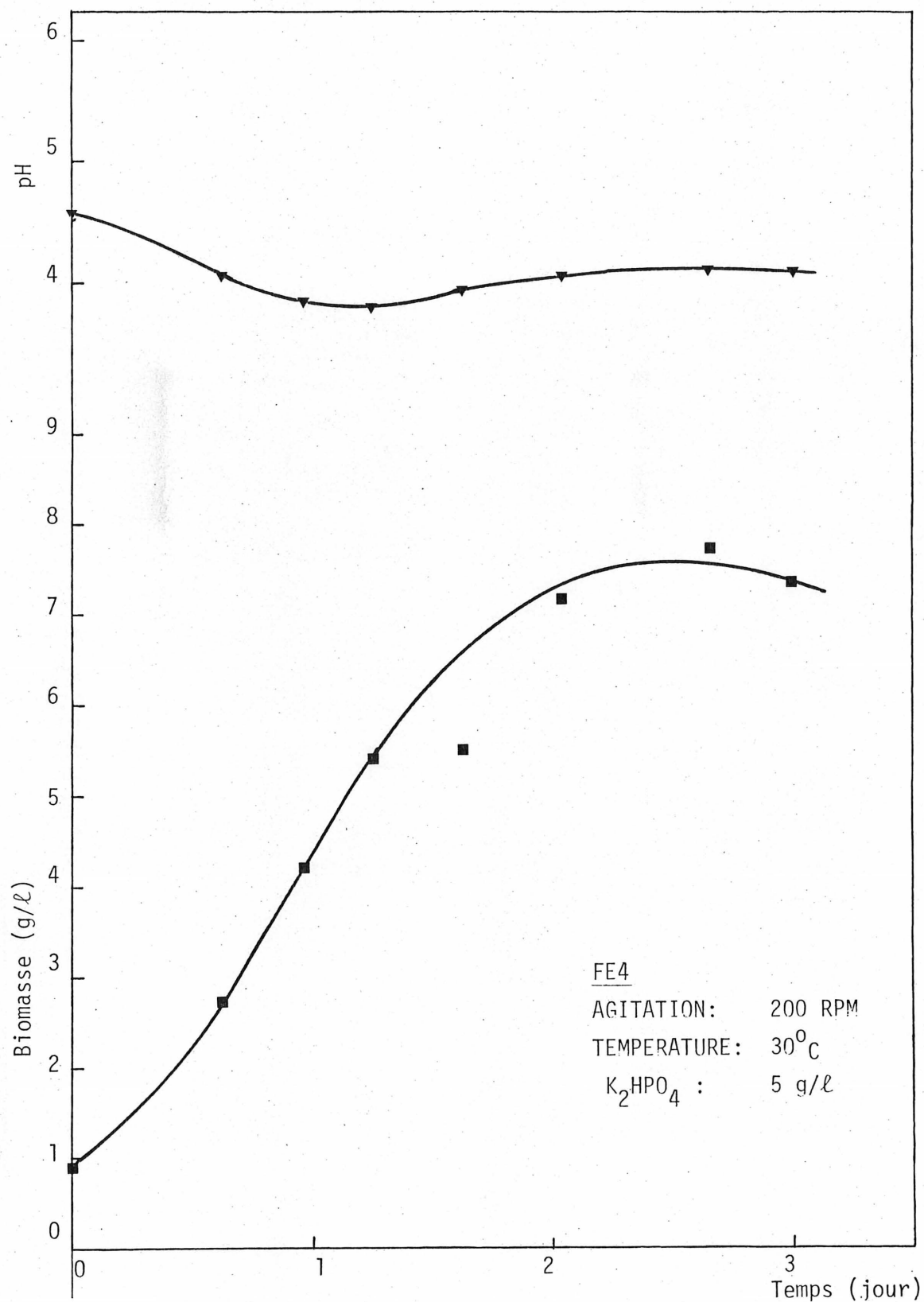


FIGURE 16: CROISSANCE DE C. UTILIS SUR HYDROLYSAT ENRICHI AVEC AZOTE ET PHOSPHATE

D'autre part, les quantités d'azote et de phosphate que nous additionnons au milieu sont bien suffisantes. En effet, nous utilisons au plus 1 g/l d'azote (la biomasse sèche de Candida utilis contient environ 8 à 10% d'azote) alors que le milieu contient du fait de l'addition d'ammoniaque, 4.8 g/l d'azote. En ce qui concerne le phosphate (K_2HPO_4) une concentration de 5 g/l est correcte car le rapport C/N/P est vérifié ⁽³⁴⁾.

Finalement, les examens microscopiques montrent que les levures poussent sous forme unicellulaire; les pseudo-mycelia sont très rares.

5.1.3 Etude de l'addition de produit antimousse.

L'utilisation d'antimousse a été rendue indispensable; lorsque l'extrait de tourbe est agité et aéré, celui-ci produit une mousse très stable qui empêche toute fermentation. En effet, la mousse est entraînée à travers la sortie d'air; on vide ainsi le fermenteur. Pour que l'antimousse soit efficace, il a fallu utiliser de fortes concentrations (supérieures à 2,500 ppm). De ce fait nous avons pensé qu'il serait bon d'étudier l'influence des différents antimousses sur la croissance. Nous pouvons ainsi choisir celui qui inhibe le moins la culture.

Trois antimousses, fournis par Dow Corning ont été étudiés:

- Antimousse Dow Corning AF (émulsion)
- Antimousse Dow Corning FG10 (émulsion)
- Antimousse Dow Corning C (émulsion, food grade).

Ces trois antimousses sont à base de silicone et doivent être dilués avant l'addition dans le fermenteur. Nous avons suivi le mode d'utilisation du fabricant.

Quatre fermentations ont été effectuées:

- FE5 blanc
- FE6 2,500 ppm d'antimousse AF
- FE7 2,500 ppm d'antimousse FG10
- FE8 2,500 ppm d'antimousse C

La figure 17 montre les résultats obtenus pour les trois fermentations, où un ralentissement de la croissance est noté. Celui-ci est pratiquement identique pour les trois antimousses. La croissance moins rapide peut être due au fait que C. utilis n'est pas acclimaté à l'antimousse. Pour retenir l'un d'entre eux nous avons essayé les trois dans le fermenteur pour des conditions d'agitation d'aération identiques. Le plus efficace a été l'antimousse AF. Celui-ci fut utilisé pour toutes les cultures dans le fermenteur.

5.2 Fermentation discontinue sur fermenteur "Chemap 007"

5.2.1 Introduction.

L'étude de la croissance en discontinue a pour but d'étudier la cinétique de croissance de Candida utilis afin de permettre la réalisation d'une fermentation continue.

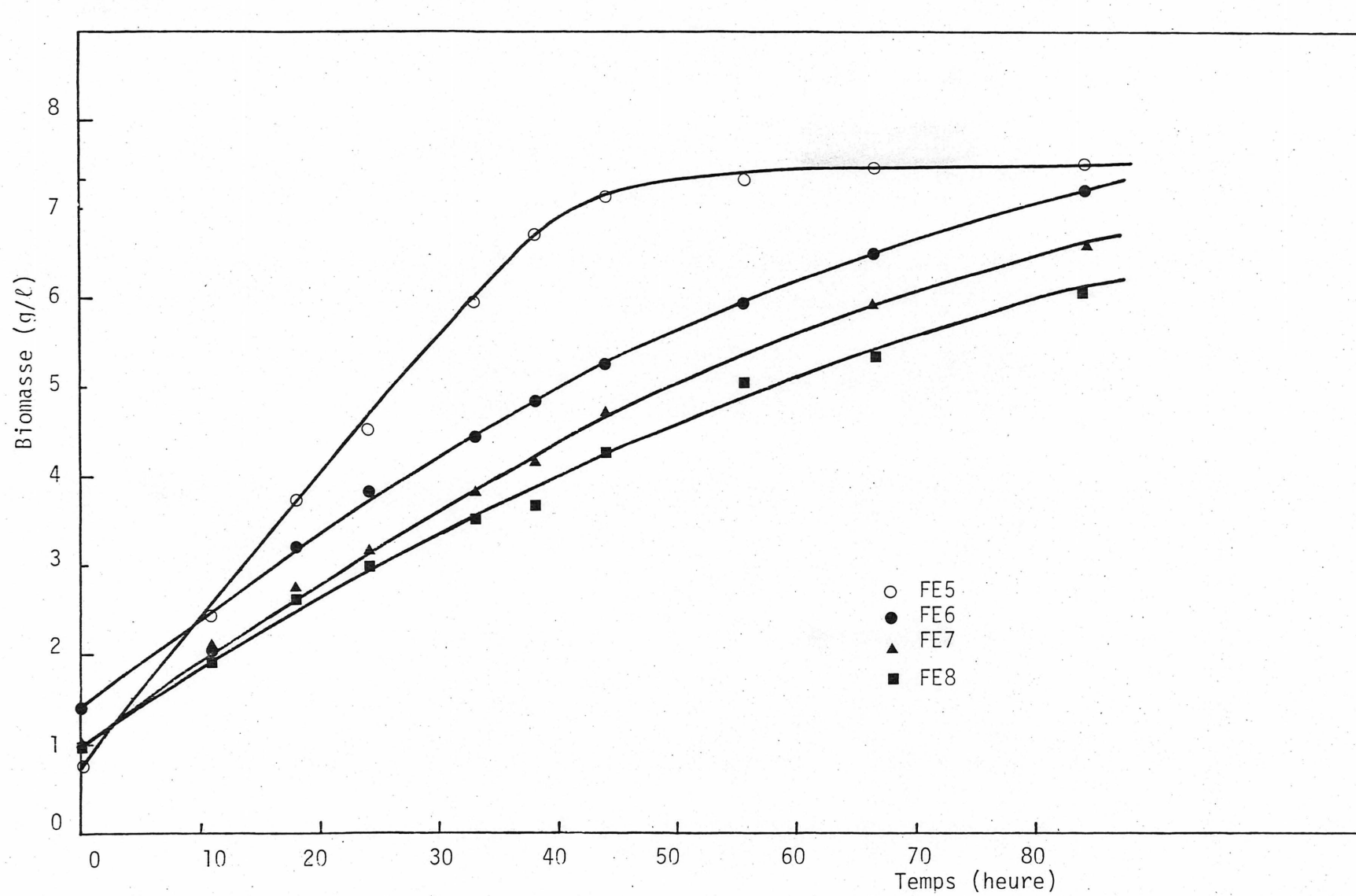


FIGURE 17: EFFET DE L'ADDITION D'ANTIMOUSSE SUR LA CROISSANCE DE C. UTILIS

Les fermentations réalisées en "batch" ont été effectuées dans les conditions suivantes.

- agitation: 500 rpm
- aération: 4.2 ℓ/mn
- volume: 4.5 ℓ
- température: 30°C
- pH: 5

L'air injecté dans le milieu de fermentation peut être exprimées en terme de volume d'air par litre de culture par minute. La valeur ainsi calculée est de 0.93 $\ell/\ell/\text{mn}$. Le choix de ce niveau d'aération a été motivé par les travaux de SINGHETOL⁽²⁷⁾ qui ont étudié l'effet de l'agitation sur la croissance de Candida utilis. Il apparaît de ces résultats que contrairement à beaucoup d'autres types de levures (Saccharomyces cerevisiae et Candida arborea), Candida utilis aura un rendement maximum par agitation seule, dans la mesure où celle-ci est suffisamment importante. Ainsi, la combinaison d'une agitation douce et d'une aération modérée (0.6 $\ell/\ell/\text{mn}$) produit de bons résultats⁽³⁾.

Le fait que l'air, nécessaire pour obtenir un rendement maximum de levures, peut être réduit par agitation, est d'un grand intérêt pratique. Ceci peut permettre le contrôle d'un moussage excessif du milieu de fermentation: un des problèmes rencontrés au cours de notre fermentation.

Pendant la croissance, la biomasse, la quantité de sucres et l'addition de base sont mesurées.

Deux fermentations "batch" ont été réalisées (FB1, FB2).

Au cours de celles-ci, le problème le plus important que nous ayons

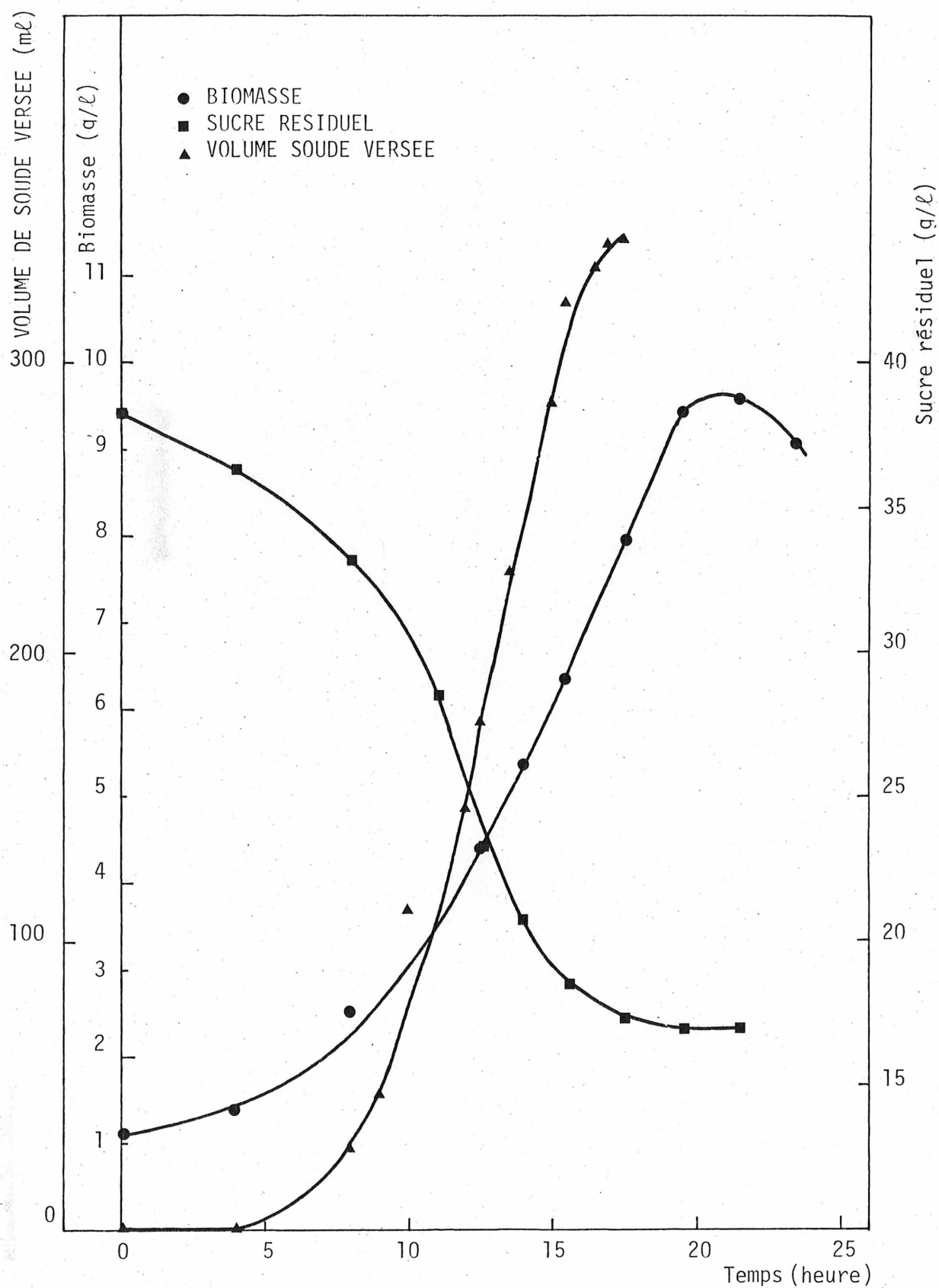
rencontré est celui du moussage. Celui-ci a été résolu par l'emploi d'agents antimousses et pour une combinaison adéquate aération-agitation.

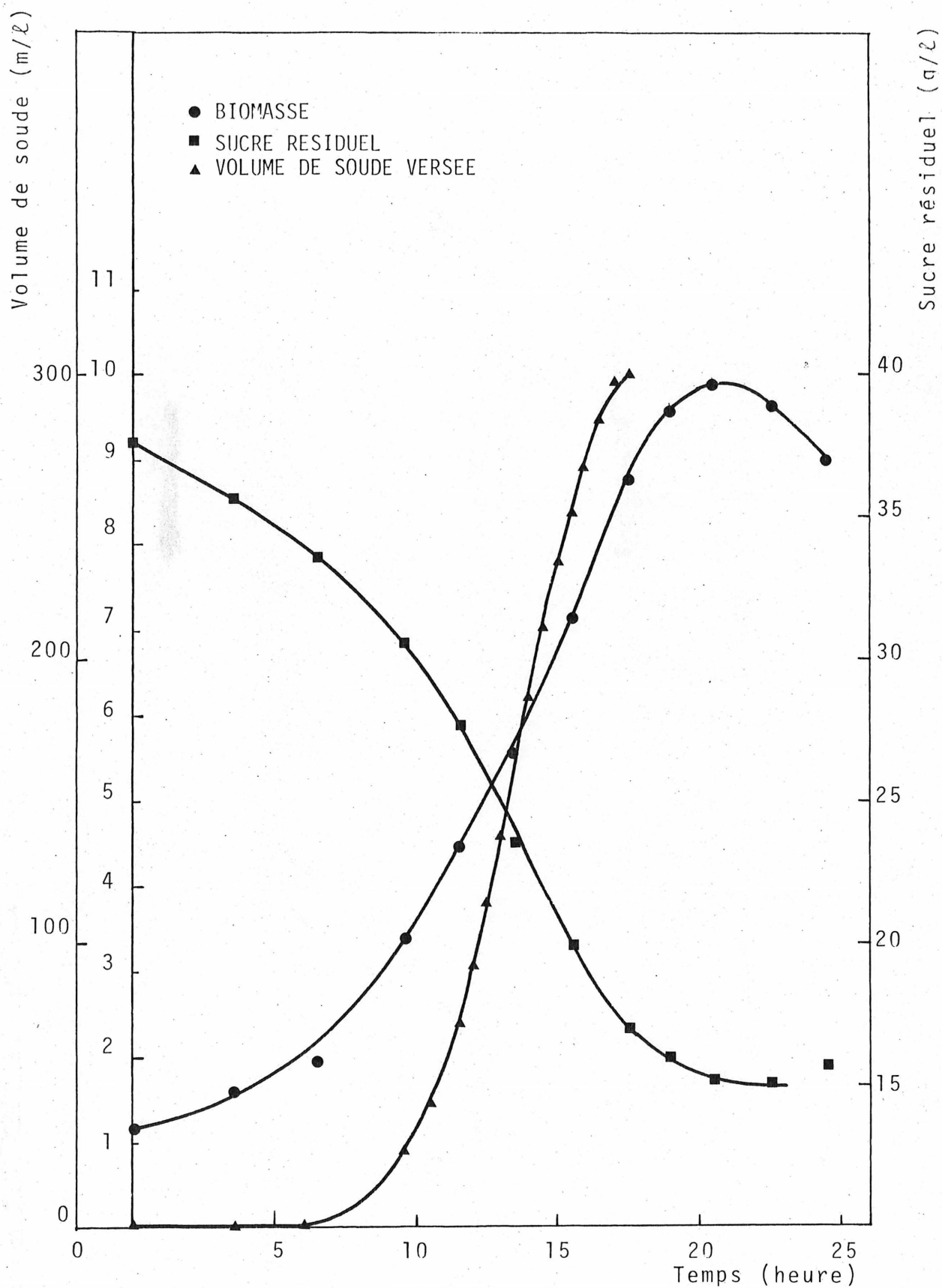
5.2.2 Résultats expérimentaux.

Les résultats sont montrés aux figures 18, 19, 20 et compilés dans les tableaux 10, 11 et 12.

5.2.2.1 Rendements.

En premier lieu, on constate que la totalité des sucres n'est pas consommée. D'après le tableau 13, on remarque que environ 55% des sucres totaux ne sont pas utilisés. Ceci est dû au fait que tous les sucres présents dans le milieu, ne sont pas fermentables. Le dosage des sucres par chromatographie pourrait confirmer cette hypothèse. Le rendement global peut ainsi être calculé soit en terme de sucres totaux, soit en terme de sucres utilisés. Le tableau 13 montre que l'on obtient un rendement d'environ 40% de sucres consommés. C'est-à-dire que plus de 60% des carbohydrates sont utilisés par la cellule à des fins énergétiques. Le rendement calculé en levures de sucres totaux est d'environ 23%.

FIGURE 18: CROISSANCE DE *C. UTILIS* (FB1)

FIGURE 19: CROISSANCE DE C. UTILIS (FB2)

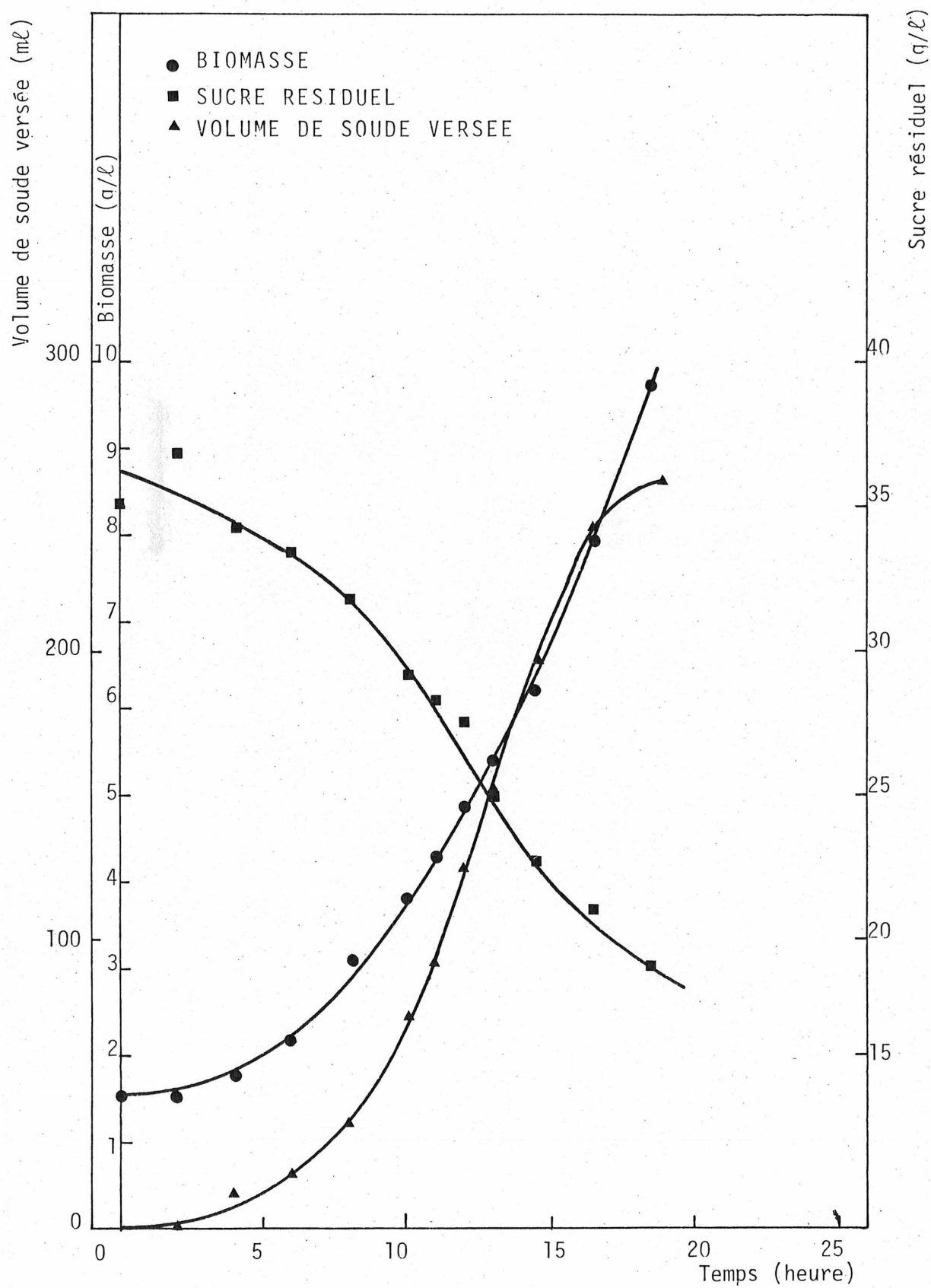


FIGURE 20: CINETIQUE DE CROISSANCE DE C. UTILIS (FB3)

TABLEAU 10

FERMENTATION FB1

Temps (heure)	Biomasse (g/l)	Sucre (g/l)	Volume de soude (ml)
0	1.1	38.2	0
4	1.4	36.3	0
8	2.55	33.1	29
11	3.5	28.5	111
12.5	4.25	23.3	177.5
14	5.4	20.7	243
15.5	6.4	18.5	321
17.5	7.95	17.3	344
19.5	9.5	17	344
21.5	9.6	17	344
23.5	9.1	17	344

TABLEAU 11

FERMENTATION FB2

Temps (heure)	Biomasse (g/l)	Sucre (g/l)	Volume de soude (ml)
0	1.2	37.6	0
3.5	1.6	35.6	0
6.5	1.9	33.6	0
9.5	3.4	30.5	27.5
11.5	4.45	27.7	72.
13.5	5.6	23.5	167
15.5	5.17	18.9	251
17.5	8.8	16.9	300
19	9.6	16	300
20.5	9.9	15.1	300
22.5	9.6	15.1	300
24.5	9	15.7	300

TABLEAU 12

FERMENTATION FB3

Temps	Biomasse (g/l)	Sucre (g/l)	Soude versée (ml)
0	1.4	35	0
2	1.4	36.3	0
4	1.75	34.3	5.8
6	2.2	33.5	9
8	3.1	31.8	18
10	3.8	29.2	36.5
11	4.3	28.3	46
12	4.9	27.5	62
13	5.4	25	76
14.5	6.2	22.7	98
16.5	7.9	21	121.2
18.5	9.7	19	129

TABLEAU 13

RENDEMENTS DES FERMENTATIONS DISCONTINUES

Fermentation	Biomasse produite (g/l)	Sucre initial (g/l)	Quantité de sucre consommé (g/l)	Rendement (%) (1)	Rendement interne de sucres (%) totaux (2)	% de sucres consommés (3)
FB1	8.5	38.2	21.2	40	22	55.3
FB2	8.7	37.6	22.6	38.5	23	60
FB3	8.3	35	16	52	24	46

(1): Biomasse produite/Quantité de sucre consommé.

(2): Biomasse produite/Sucre initial.

(3): Quantité de sucre consommé/Sucre initial.

5.2.2.2 Caractéristiques de croissance.

Bien que l'étude de la cinétique de croissance est reprise dans le chapitre consacré au lissage et à la modélisation, on peut constater quelques points importants.

On remarque, en premier lieu que nous obtenons les trois phases habituelles:

- une phase de latence due à l'acclimatation (d'ailleurs assez courte);
- une phase de croissance exponentielle;
- une phase de ralentissement due à l'épuisement du substrat carboné.

En ce qui concerne, la phase exponentielle, le tracé du logarithme de la biomasse, nous montre que le taux de croissance est constant tout au long de la phase exponentielle (figure 21). Pour les trois fermentations (FB1, FB2, FB3), nous obtenons trois droites parallèles. Celles-ci sont décalées car les conditions initiales ne sont pas exactement semblables pour chaque fermentation.

La mesure de la pente de la droite nous donne le taux de croissance spécifique μ .

où α est la pente de la droite $\text{Log}_{10} X = f(t)$

$$\alpha = \frac{d(\text{Log}_{10} X)}{dt} = \frac{1}{2.3} \cdot \frac{d(\text{Ln } X)}{dt}$$

$$\alpha = \frac{1}{2.3} \frac{1}{X} \frac{dX}{dt}$$

donc:

$$\mu = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} = 2.3 \alpha$$

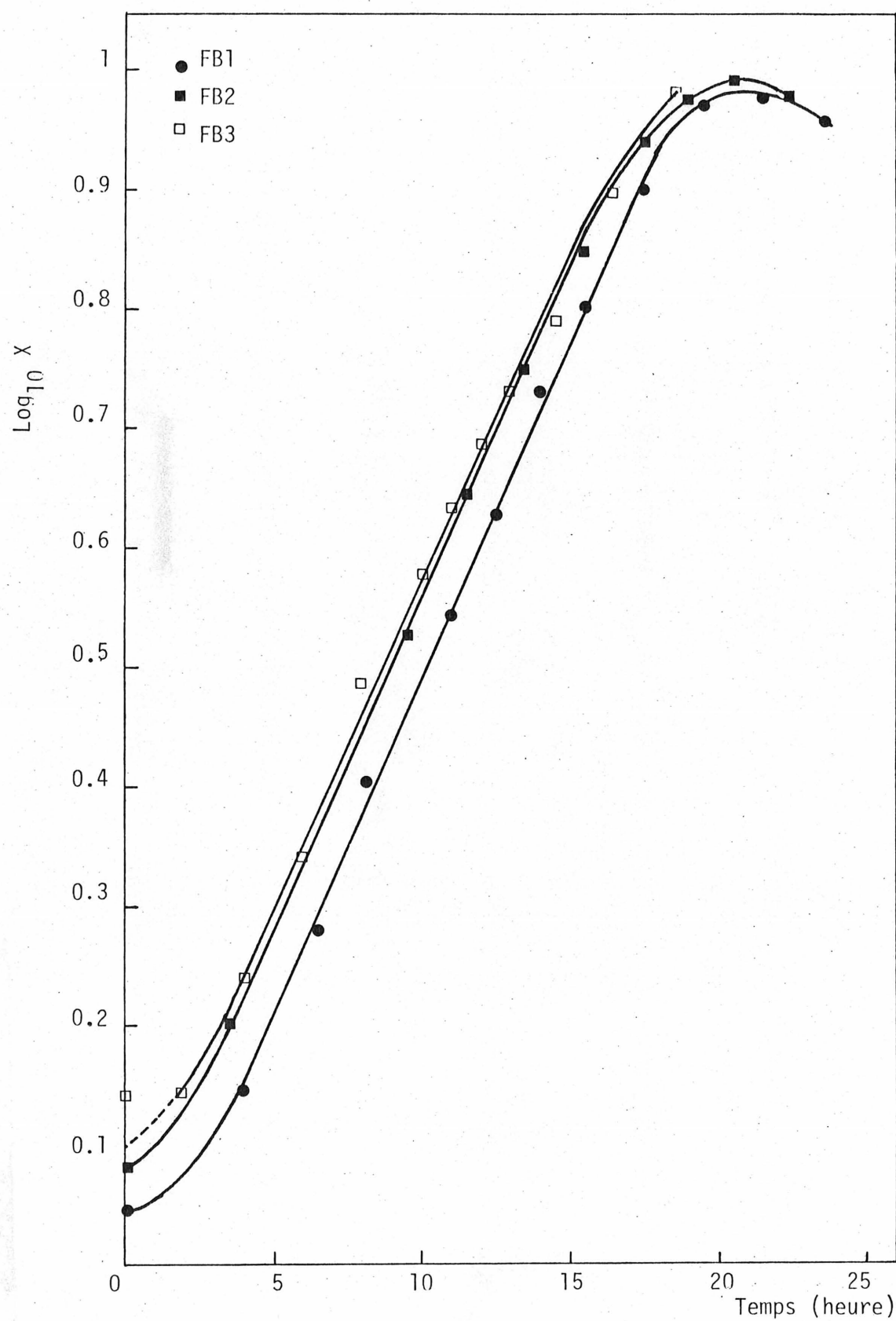


FIGURE 21: VARIATION DU LOGARITHME DE LA BIOMASSE AU COURS DU TEMPS

On obtient ainsi un taux de croissance spécifique μ de $0.13h^{-1}$ pour FB1 et FB2. Considérant les résultats obtenus pour la fermentation FB3, point de départ de la culture en continu, nous obtenons un taux de croissance identique.

La connaissance de μ , nous permet de calculer G, le temps nécessaire pour doubler la biomasse pendant la phase exponentielle.

$$X = X_0 e^{\mu t}$$

$$t = G; X = 2X_0$$

$$2 = e^{\mu G} \quad \text{donc} \quad G = \frac{\ln 2}{\mu}$$

aussi,
$$G = \frac{\ln 2}{0.13} = 5.3h$$

5.2.2.3 Utilisation de la mesure de volume de base versée.

Nous avons remarqué lors des fermentations dans les erlenmeyers que le pH baisse pendant la phase de croissance. Ceci est dû à l'excrétion de métabolites acides. Lors des fermentations FB1 et FB2, il nous a fallu ajouter de la soude pour neutraliser ces métabolites et ainsi maintenir le pH constant. Le volume de base, ainsi additionné a été mesuré tout au long de la fermentation. D'après les figures 18 et 19, nous pouvons constater que la courbe de croissance et la courbe de l'addition de la soude ont une allure identique. Pendant la phase de latence, le volume de soude additionné est nul, en ce qui concerne la phase de croissance, l'addition de la soude est proportionnelle à la biomasse produite comme le montre la figure 22. Les pentes des

droites ainsi obtenues sont identiques pour FB1 et FB2 car nous avons utilisé de la soude 0.5N. Pour la fermentation FB3, la pente est 2.5 fois plus faible puisque nous avons utilisé de la soude 1.25N. Les droites n'ont toutefois pas la même origine; ceci est dû à la phase de latence. Ceci limite son utilisation pour corréler la biomasse produite avec la soude versée.

D'autre part, on constate que la fin de la phase exponentielle coïncide avec l'arrêt de l'addition de base. Ceci est constaté pour les deux fermentations. Nous pourrions ainsi connaître immédiatement l'instant où il faut débiter la fermentation continue, car la méthode de la mesure de la biomasse ne permet pas de connaître ce moment instantanément.

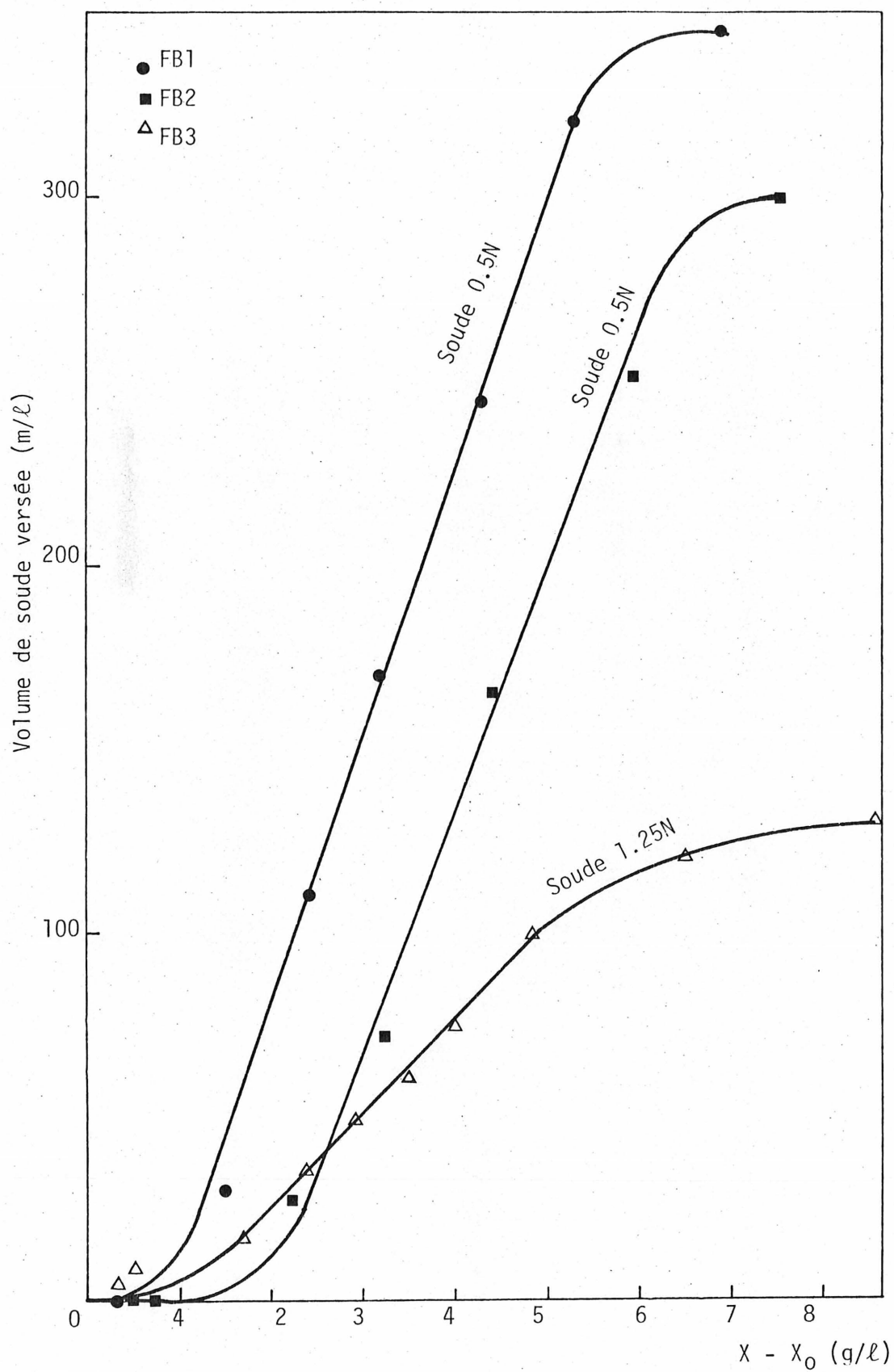


FIGURE 22: CORRELATION GRAPHIQUE BIOMASSE - SOUDE VERSEE

CHAPITRE 6

FERMENTATION CONTINUE

6.1 Introduction.

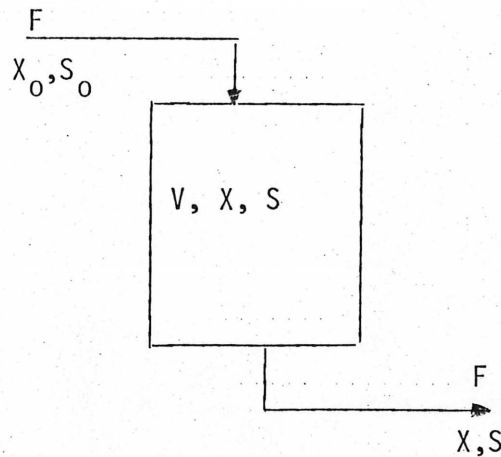
La fermentation continue est réalisée par un apport de milieu nutritif et par un mi-soutirage d'une quantité égale de milieu réactionnel.

La connaissance du taux de croissance de Candida utilis, déduit des fermentations discontinues, nous a permis d'estimer le débit optimum. Ceci a orienté le choix de la pompe que nous avons utilisée pour l'alimentation en continu.

Les conditions expérimentales ont été décrites précédemment. La fermentation en continu est lancée lorsque la phase exponentielle se termine, c'est-à-dire lorsque l'addition de base n'est plus nécessaire.

6.2 Théorie de la fermentation continue.

Pour cette étude, nous considérerons que la fermentation est parfaitement agitée; ainsi la concentration en substrat et en biomasse est la même dans le réacteur et dans le milieu soutiré.



Bilan sur la biomasse:

$$\left(\frac{dX}{dt}\right)_{\text{accumulation}} V = F X_0 - F X + V \left(\frac{dX}{dt}\right)_{\text{croissance}}$$

ou,

$$\left(\frac{dX}{dt}\right)_{\text{croissance}} = \mu X \quad \text{et } X_0 = 0 \quad \text{car le fermenteur est alimenté en milieu stérile.}$$

ainsi,

$$\left(\frac{dX}{dt}\right)_a V = V\mu X - FX$$

$$\left(\frac{dX}{dt}\right)_a = \mu X - \frac{F}{V} X \quad \text{ou } \frac{F}{V} = D$$

$$\boxed{\left(\frac{dX}{dt}\right)_a = (\mu - D) X}$$

En régime permanent $\mu = D$

Bilan sur le substrat:

$$\left(\frac{dS}{dt} \right)_V^{\text{accumulation}} = F (S_0 - S) + V \left(\frac{dS}{dt} \right)_{\text{croissance}}$$

si,

$$Y = - \frac{\left(\frac{dX}{dt} \right)_{\text{croissance}}}{\left(\frac{dS}{dt} \right)_{\text{croissance}}} \quad \left(\frac{dS}{dt} \right)_c = - \frac{1}{Y} \left(\frac{dX}{dt} \right)_c = - \frac{\mu X}{Y}$$

alors,

$$V \left(\frac{dS}{dt} \right)_a = F (S_0 - S) - \frac{V \mu X}{Y}$$

$$\left(\frac{dS}{dt} \right)_a = \frac{F}{V} (S_0 - S) - \frac{\mu X}{Y}$$

$$\boxed{\left(\frac{dS}{dt} \right)_a = (S_0 - S) D - \frac{\mu X}{Y}}$$

en régime permanent

$$D (S_0 - S) = \mu \frac{X}{Y}$$

comme,

$$\mu = D \quad X = Y (S_0 - S)$$

6.3 Etude de la variation du taux de dilution.

La variation du taux de dilution va nous permettre de trouver sa valeur optimale. Des résultats obtenus en discontinu, nous avons déduit un estimé du taux de dilution. Compte tenu que le volume du réacteur est d'environ 4 l et que le taux de croissance maximum est $0.13h^{-1}$, nous pensons que le débit optimum sera d'environ 500 mL/h. Nous avons ainsi fait varier le débit entre 100 et 700 mL/h. Chaque débit était maintenu pendant environ 24h, ce qui correspond à environ 5 fois le temps de génération (voir figure 23).

D'autre part, du fait d'un changement dans la manière de stériliser, nous avons eu des variations de la concentration en sucre au cours de la manipulation. Nous avons ainsi une concentration d'environ 34 g/l jusqu'à 137 h de fonctionnement; par la suite la concentration est d'environ 30 g/l. La perturbation observée aux environs de 85h de fonctionnement n'a pu être expliquée.

Ainsi à l'équilibre, $\mu = \mu_{\max} \frac{S}{K_S + S}$, on peut ainsi déduire pour $\mu = D$

$$S = \frac{D K_S}{\mu_{\max} - D}$$

donc si, $P = DX = DY \left(S_0 - \frac{DK_S}{\mu_{\max} - D} \right)$

La valeur optimale de D sera celle pour laquelle $\frac{dP}{dD} = 0$

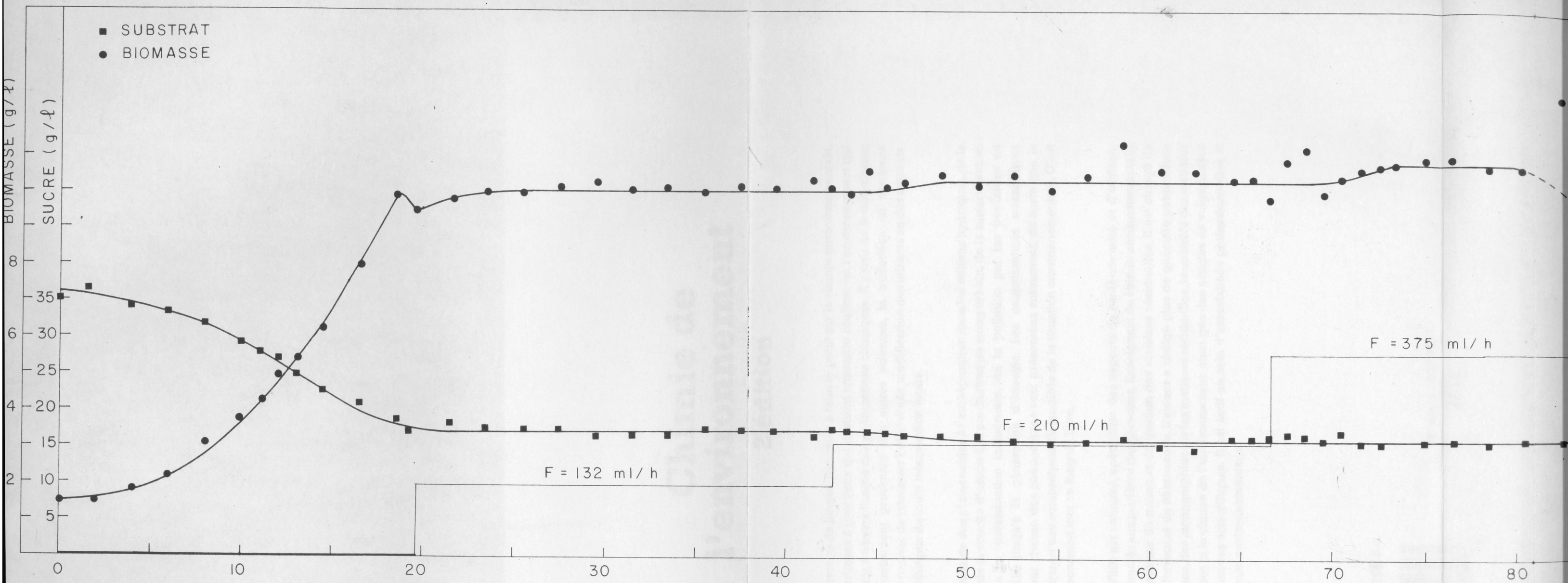
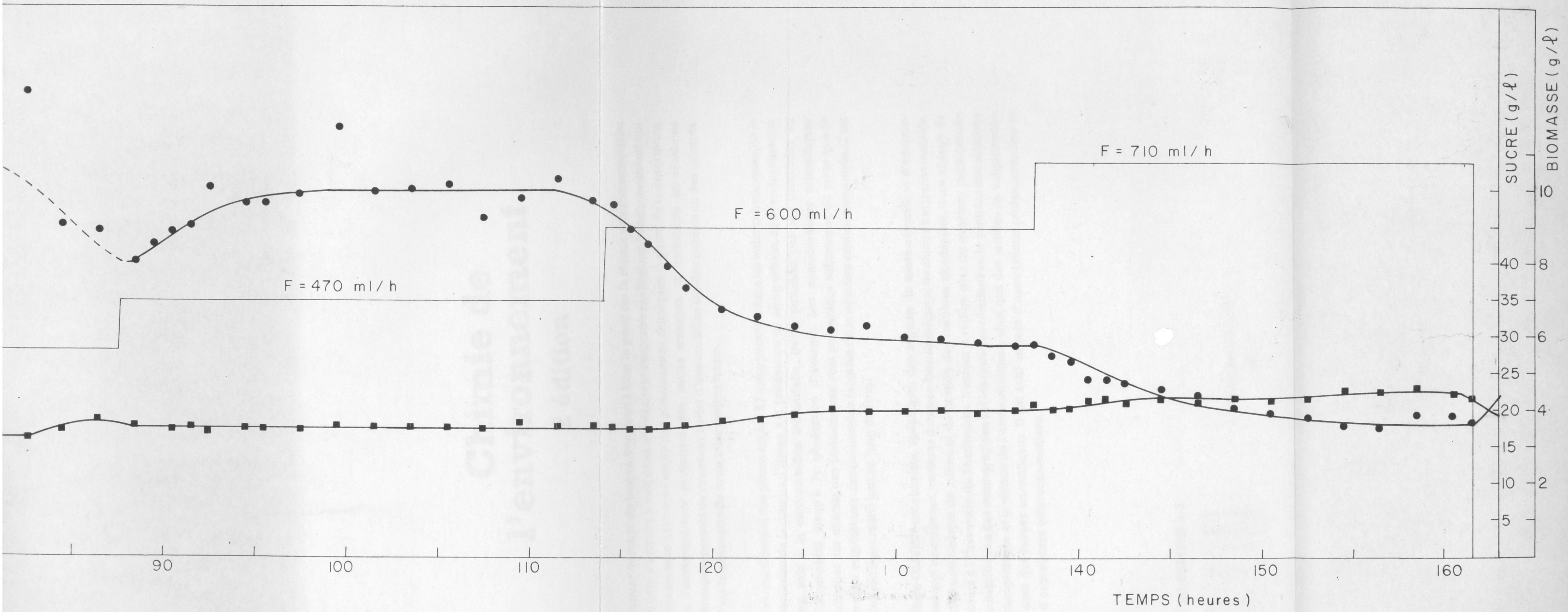


FIGURE 23 : FERMENTATION EN CO



CONTINU (1^{ere} partie)

donc,

$$\frac{d(YS_0 D)}{dD} - \frac{d}{dD} \left(\frac{D^2 YK_S}{\mu_{\max} - D} \right) = 0$$

$$YS = \frac{2DYK_S (\mu_{\max} - D) + D^2 YK_S}{(\mu_{\max} - D)^2}$$

en développant on obtient:

$$\frac{D^2}{\mu_{\max}^2} - 2 \frac{D}{\mu_{\max}} + \frac{S_0}{K_S + S_0} = 0$$

$$D_{\text{opt}} = \mu_{\max} \left(1 - \sqrt{\frac{K_S}{K_S + S_0}} \right)$$

L'autre solution donne un $D_{\text{opt}} > \mu_{\max}$ ce qui est impossible. Dans notre cas $D_{\text{opt}} < \mu_{\max}$, ce qui signifie que K_S est très petit devant S_0 . Ceci confirme le fait que le taux de croissance spécifique est maximum pendant toute la phase de croissance.

6.4 Résultats expérimentaux et discussion.

Le tableau 14 présente les différents résultats déduit de la figure 23. Nous avons aussi tracé les concentrations, à l'équilibre, de biomasse et de sucre résiduel, en fonction du taux de dilution (figure 24). Nous obtenons une chute de biomasse maximum pour un taux de dilution de 0.155 h^{-1} . Précédemment, nous avons eu une légère montée de la biomasse. Ceci est dû au fait que pour un taux de dilution nettement inférieur au taux de croissance spécifique maximum, le phéno-

TABEAU 14: RESULTATS EXPERIMENTAUX DE LA FERMENTATION CONTINUE

F (mℓ/h)	V (ℓ)	D (h ⁻¹)	X (g/ℓ)	S ₀ (g/ℓ)	S (g/ℓ)	P = DX (gℓ ⁻¹ h ⁻¹)	*Rendement (%)
132	3.8	0.035	10	34	17.0	0.350	58.8
210	3.8	0.055	10.3	34	16.5	0.567	58.9
375	3.8	0.099	10.8	34	16.5	1.069	61.7
470	3.8	0.124	10	34.3	17.5	1.240	59.5
600	3.8	0.158	5.8	33.5	20	0.916	43.0
710	3.8	0.187	3.7	30	22.5	0.692	49.3
380	3.8	0.100	9	30	15	0.900	60.0
470	3.8	0.124	8.5	30.5	17.5	1.054	65.4

* Rendement (%) = $X (S_0 - S)$

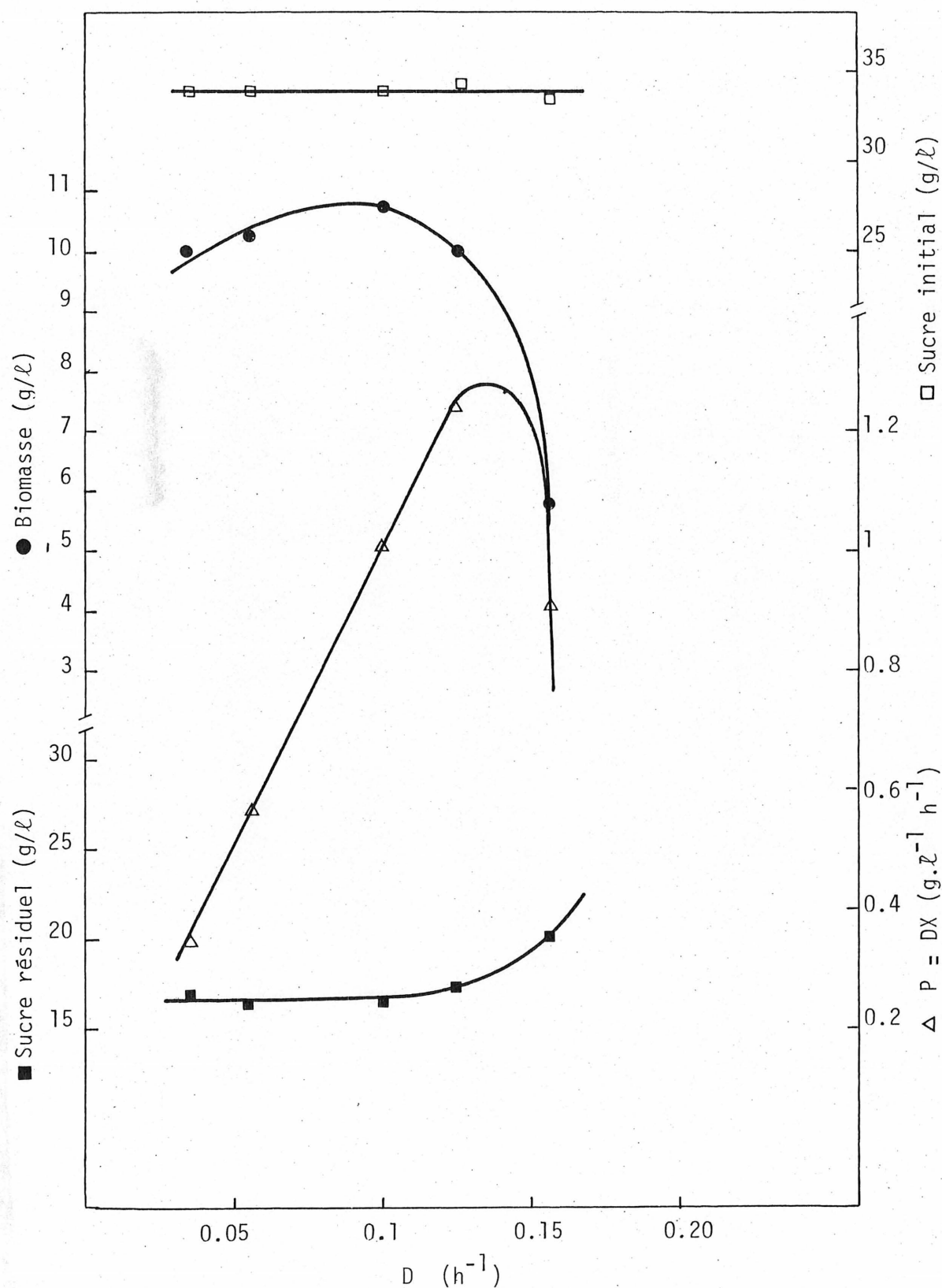


FIGURE 24. ETUDE DE L'EFFET DE LA VARIATION DU TAUX DE DILUTION

mène de métabolisme endogène et de mortalité de cellules est très fort. D'autre part, on constate une légère augmentation du rendement, ce qui confirme l'hypothèse mentionnée précédemment. Le temps de séjour des cellules est beaucoup plus grand que le temps de la métabolisation totale des sucres; aussi les cellules doivent puiser sur leurs réserves pour survivre car il n'y a plus de substrat. Ce qui a pour effet de faire baisser le rendement. A la limite certaines cellules meurent.

Si l'on trace, la productivité $P = DX$ en fonction du taux de dilution (voir figure 24) nous obtenons la valeur maximum pour un taux de dilution d'environ 0.125 h^{-1} . Celui-ci est proche du taux de croissance maximum obtenu en fermentation "batch" où nous avons 0.13 h^{-1} .

D'autre part, on remarque que le rendement est supérieur à celui obtenu en batch puisqu'il est de l'ordre de 60%.

6.5 Etude de la stabilité du système au taux de dilution optimum.

Nous avons effectué des perturbations sur le pH et sur la température afin de connaître la stabilité du système (figure 25).

6.5.1 Changement de température.

Nous avons fait varier la température de 30⁰ à 25⁰C pendant 4h. On peut relever un changement de la concentration en biomasse à l'équilibre. En effet celle-ci diminue très légèrement (environ .5 g/l). Cette diminution de la biomasse s'accompagne d'une augmentation de la concentration en sucre (environ 1 g/l). On a donc une baisse du taux de croissance. Mais l'effet de la température n'a pas été concluant car nous n'avons pas laissé le système revenir à l'équilibre.

6.5.2 Changement de pH.

Le changement de pH s'est effectué en affichant un pH de 6 pendant 14 heures. La réponse à la perturbation est difficile à analyser car nous ne sommes pas partis du système à l'équilibre. Toutefois on peut remarquer une stabilisation à une valeur de 8.5 g/l. La concentration en sucre, quant à elle, est remontée jusqu'à 17 g/l. On peut tout de même conclure que le système est assez stable vis à vis de cette variation de pH.

6.5.3 Changement de débit.

Nous avons augmenté le débit de 375 à 470 mL/h. Nous avons enregistré une diminution de la concentration en biomasse d'environ 0.5 g/L; la concentration en sucre quant à elle, a remonté à 17.5 g/L. Les résultats sont sensiblement identiques à ceux enregistrés lors de l'étude des débits. Ici la seule différence est la concentration initiale en sucre.

CHAPITRE 7

LISSAGE ET MODELISATION DES RESULTATS EXPERIMENTAUX

7.1 Introduction.

La modélisation des cinétiques de croissance est envisagée dans le but d'obtenir des paramètres utilisables dans le contrôle de la fermentation.

Beaucoup d'expressions ont été proposées pour rendre compte des cinétiques de croissance, mais celle qui a été le plus acceptée est donnée par MONOD⁽¹⁹⁾. Nous essayerons donc plus particulièrement ce modèle. Celui-ci s'applique à la croissance d'une culture pure d'organismes unicellulaires. En faisant l'analogie avec les équations spécifiées par MICHAELIS-MENTEN pour les cinétiques enzymatiques, une expression du taux de croissance a été déduite.

$$\mu = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} = \mu_{\max} \frac{S}{K_S + S} \quad (1)$$

μ_{\max} est le taux de croissance maximum.

$\frac{S}{K_S + S}$ est le terme qui tient compte du ralentissement de la croissance lorsque le substrat devient limitant. K_S est la constante de saturation. On remarque ainsi que lorsque $K_S \ll S$, $\mu = \mu_{\max}$; nous avons alors une croissance de forme exponentielle. Quand S devient petit, K_S prend alors une certaine importance et permet ainsi de rendre compte de la diminution du taux de croissance.

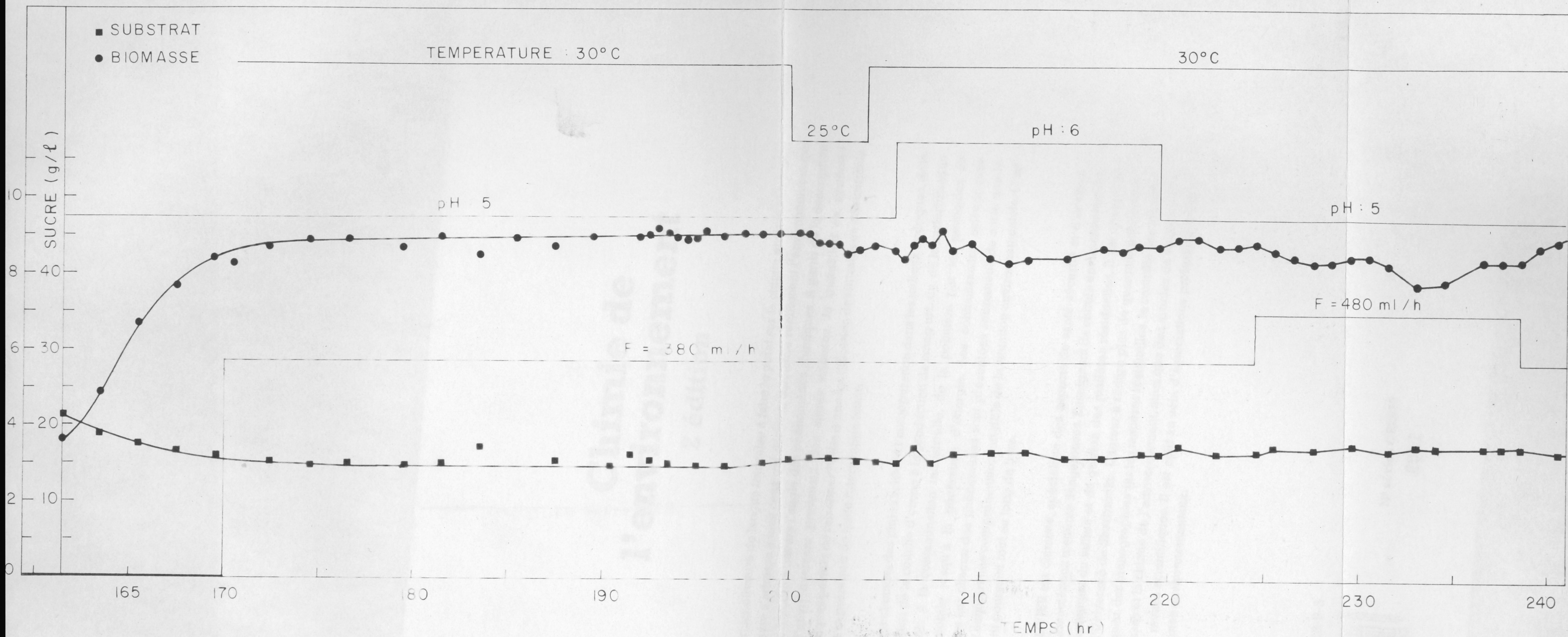


FIGURE 25 FERMENTATION CONTINUE (2^{ème} partie)

Après obtention des paramètres K_s et μ_{\max} , l'intégration des équations différentielles suivantes, nous permet d'obtenir les variations de la biomasse et du substrat en fonction du temps.

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{\max} \frac{SX}{K_s + S} \quad (2)$$

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{1}{Y} \frac{dX}{dt} \quad (3)$$

Le terme Y exprime le rendement. Celui-ci est supposé constant tout au long de la fermentation. Ce terme est estimé de façon globale en faisant le rapport de la quantité de biomasse produite et de la quantité de sucres consommée.

7.2 Calcul des paramètres du modèle de MONOD par une méthode indirecte.

Les résultats expérimentaux nous permettent de disposer des variations temporelles de la biomasse et du substrat résiduel. Du calcul de la dérivée première de $X(t)$, on peut déduire le taux de croissance $\mu = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt}$.

Ainsi la connaissance de $\mu(t)$ et $S(t)$, nous conduit aux paramètres du modèle de MONOD de la façon suivante.

$$\begin{aligned} \mu &= \mu_{\max} \frac{S}{K_s + S} \\ \frac{1}{\mu} &= \frac{K_s}{\mu_{\max}} \frac{1}{S} + \frac{1}{\mu_{\max}} \end{aligned} \quad (4)$$

Le lissage de la droite $\frac{1}{\mu} = f\left(\frac{1}{S}\right)$ nous donne K_s et μ_{\max} .
L'obtention des paramètres du modèle de MONOD se fera donc en trois étapes.

- lissage et interpolation de $X(t)$ et $S(t)$;
- calcul de dX/dt et de μ ;
- lissage par la méthode des moindres carrés de $\frac{1}{\mu} = f\left(\frac{1}{S}\right)$ afin d'obtenir les paramètres K_s et μ_{\max} .

Après avoir obtenu les paramètres, l'intégration des équations différentielles (2 et 3) sera faite pour comparer avec les résultats expérimentaux.

7.2.1 Lissage et interpolation des points expérimentaux de $S(t)$ et $X(t)$.

7.2.1.1 Méthode utilisée.

La méthode utilisée devra, dans une première étape, interpoler les valeurs expérimentales, et, dans une seconde, calculer les dérivées premières.

Ceci peut être réalisé en utilisant la méthode du spline cubique ⁽¹⁾. Elle consiste à faire passer une cubique par chaque couple de points en vérifiant les critères de continuité de la fonction et de ses dérivées premières et secondes.

Mais du fait que les points expérimentaux sont entachés d'une erreur et que la méthode du spline cubique passe par tous les points nous obtenons une courbe qui oscille entre chaque point expérimental.

L'erreur, ainsi obtenue, est alors amplifiée au niveau du calcul de la dérivée. Dans le but d'éviter cet inconvénient, HANG⁽⁶⁾ propose un pré-lissage des points expérimentaux. Celui-ci consiste à faire passer une quadratique par les points 1, 2, 3, 4, 5 par la méthode des moindres carrés. Le point 3 est alors recalculé. Ainsi, si celui-ci est trop haut ou trop bas par rapport aux points adjacents, il sera réajusté. Le processus est répété en utilisant le nouveau point 3 pour 2, 3, 4, 5, 6 et ainsi de suite jusqu'à la fin des données.

Ceci peut être fait plusieurs fois de suite; mais comme le lissage tend à enlever le caractère de la courbe, l'auteur conseille de la limiter à deux ou trois itérations.

D'autre part, on remarque que tous les points sont lissés, sauf les deux premiers, et les deux derniers. Pour pouvoir corriger, le 2ième et $n-1^{eme}$ point, HANG interpole deux points supplémentaires, très proches du 1er et du dernier.

Le lissage et l'interpolation des résultats expérimentaux ont été effectués par le sous programme SPIFIT (voir annexe B) d'après le programme de HANG. Celui-ci a été modifié de façon à calculer les dérivées premières. Ceci est réalisé avec le spline cubique.

7.2.1.2 Résultats expérimentaux et discussion.

Deux fermentations discontinues sont analysées: FB1 et FB2.

Le lissage et l'interpolation des courbes de croissance de la biomasse

et de consommation en sucre sont réalisés. Le tableau suivant montre le degré de lissage auquel nous avons soumis les différentes courbes. Le facteur "MS" est le nombre de lissage effectué sur les points expérimentaux .

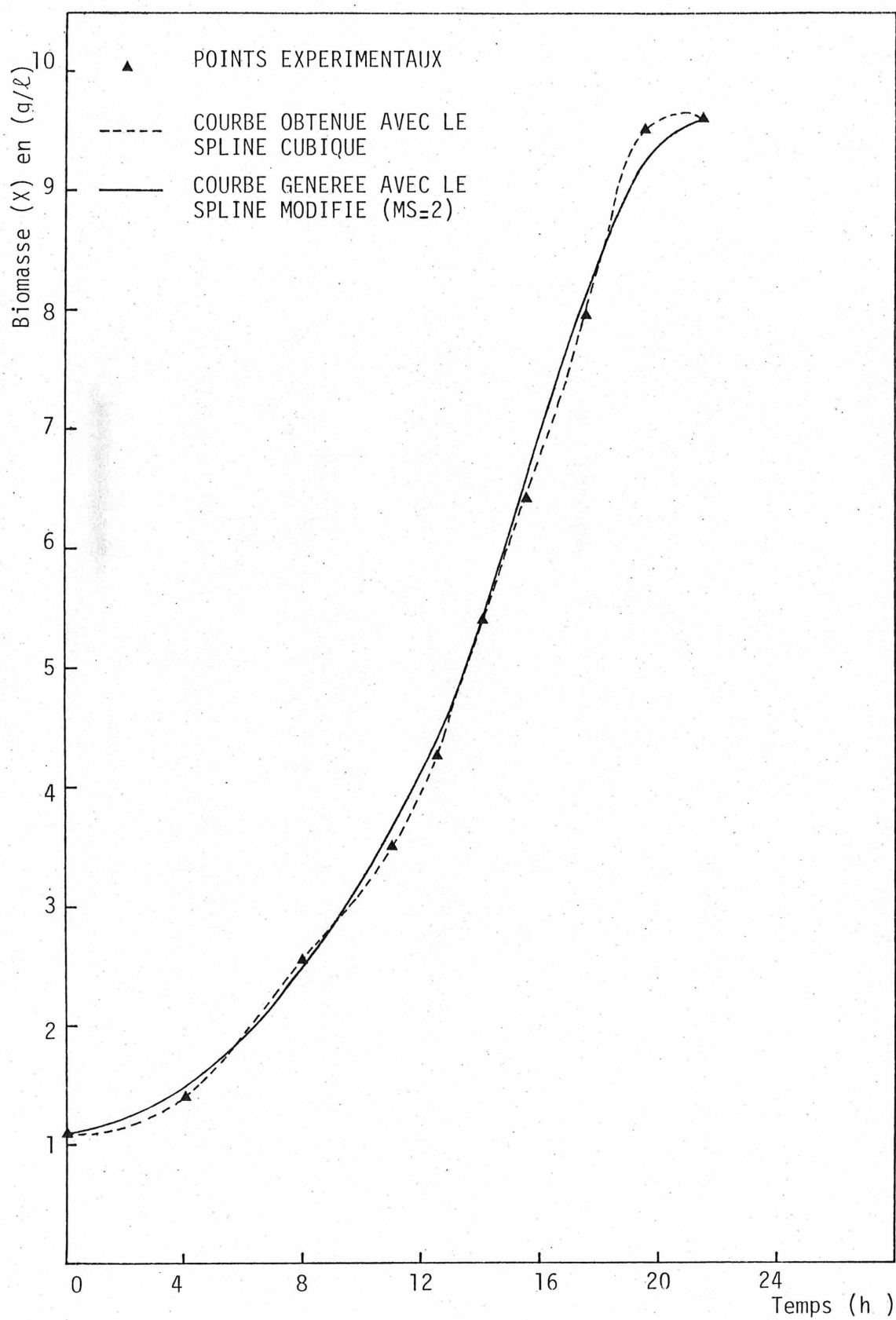
DESIGNATION DE LA COURBE A LISSE ET A INTERPOLER.	DESIGNATION DE LA FERMENTATION	
	FB1	FB2
$x(t)$	MS = 2	MS = 1
$s(t)$	MS = 2	MS = 0

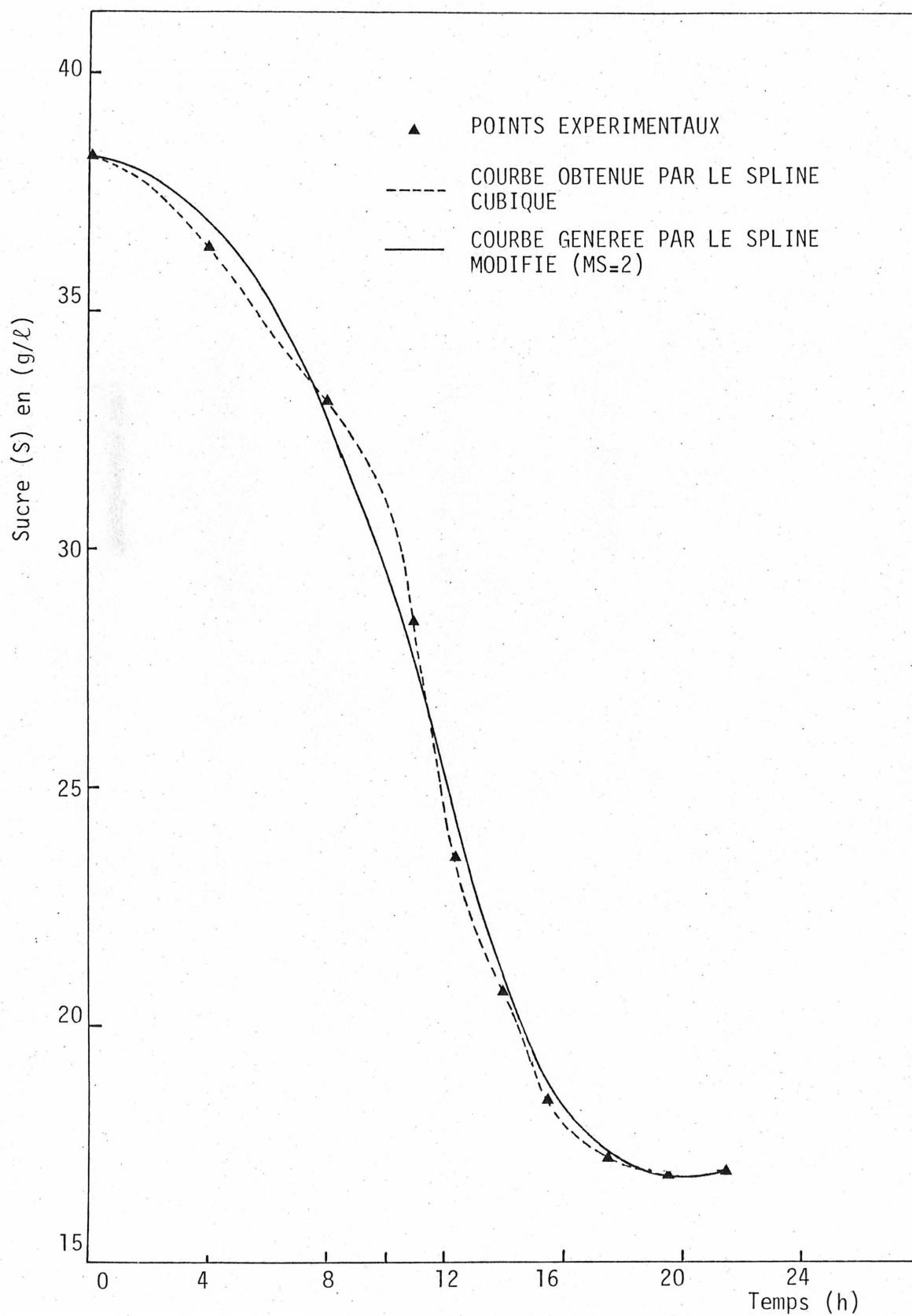
Dans le cas de la fermentation FB1, nous constatons qu'il est nécessaire de lisser deux fois les résultats expérimentaux avant l'interpolation. En effet, nous remarquons dans les deux cas que l'utilisation du spline seul ($MS=0$) conduit à des oscillations (voir figures 26 et 27). Celles-ci ont une énorme répercussion sur le calcul de la dérivée première comme le montre la figure 28.

D'autre part l'utilisation trop importante du lissage ($MS > 3$) crée une dégénération de la courbe; HANG signalait aussi ce phénomène dans son article. Ainsi dans notre cas pour $MS = 2$ la courbe $X(t)$ s'écarte légèrement des données expérimentales dans la partie finale de la fermentation. Ceci s'accroît lorsque l'on augmente le degré de lissage.

En ce qui concerne FB2, les résultats expérimentaux étant moins dispersés, l'utilisation du spline cubique donne de bons résultats (voir figures 29 et 30). Toutefois pour obtenir une meilleure estimation de la dérivée nous avons jugé bon de lisser une fois $X(t)$. On remarque que ceci donne une courbe pratiquement identique à la précédente ($MS = 0$) à l'exception du second point où un écart est noté.

En conclusion, l'utilisation du programme SPIFIT, nous conduit à de bons résultats puisqu'il supprime en général les oscillations tout en respectant l'allure générale de la courbe. Le pré-lissage doit toutefois être utilisé avec prudence.

FIGURE 26: LISSAGE DE $x(t)$ POUR FB1

FIGURE 27: LISSAGE DE $S(t)$ POUR FBI

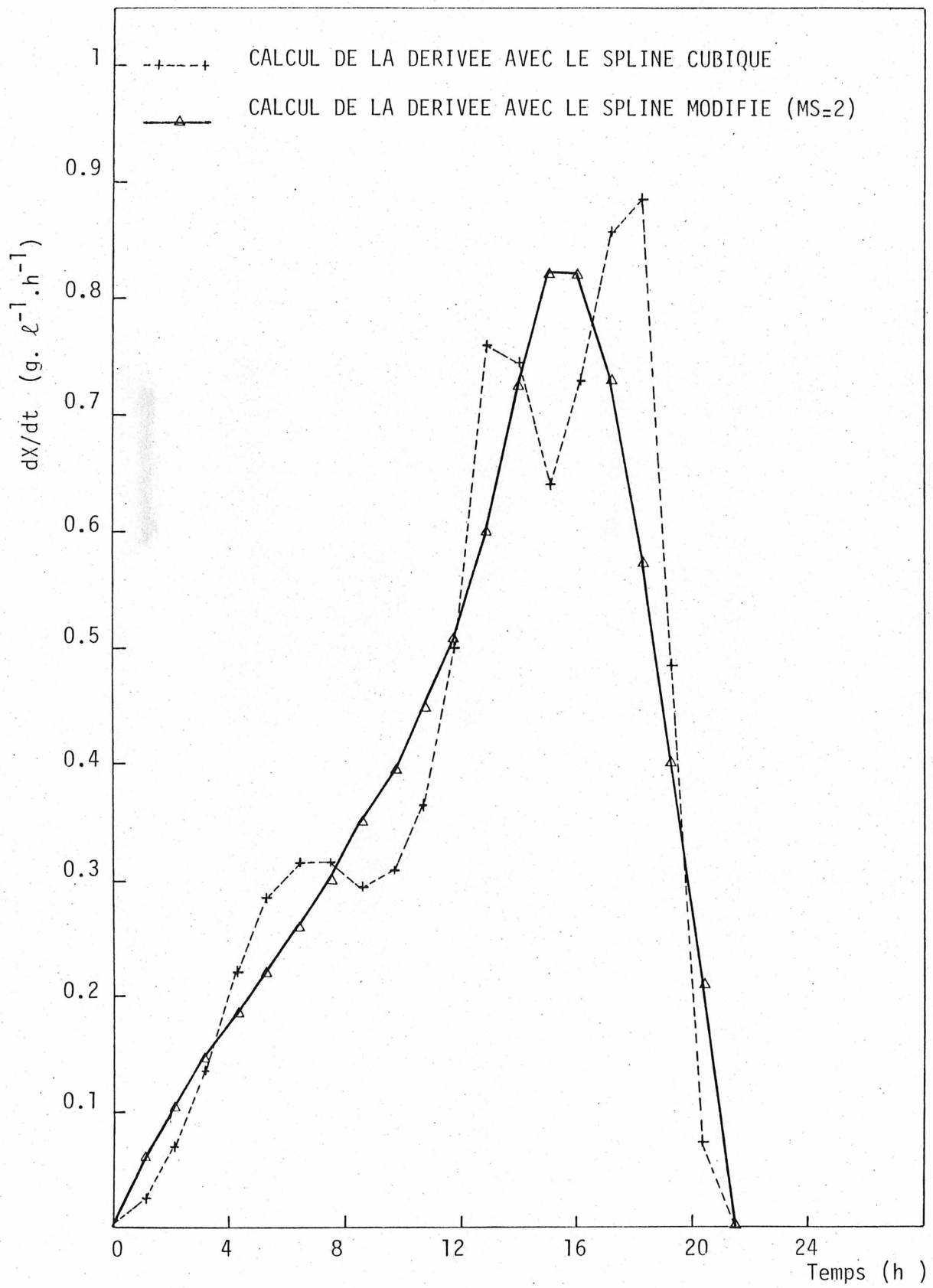
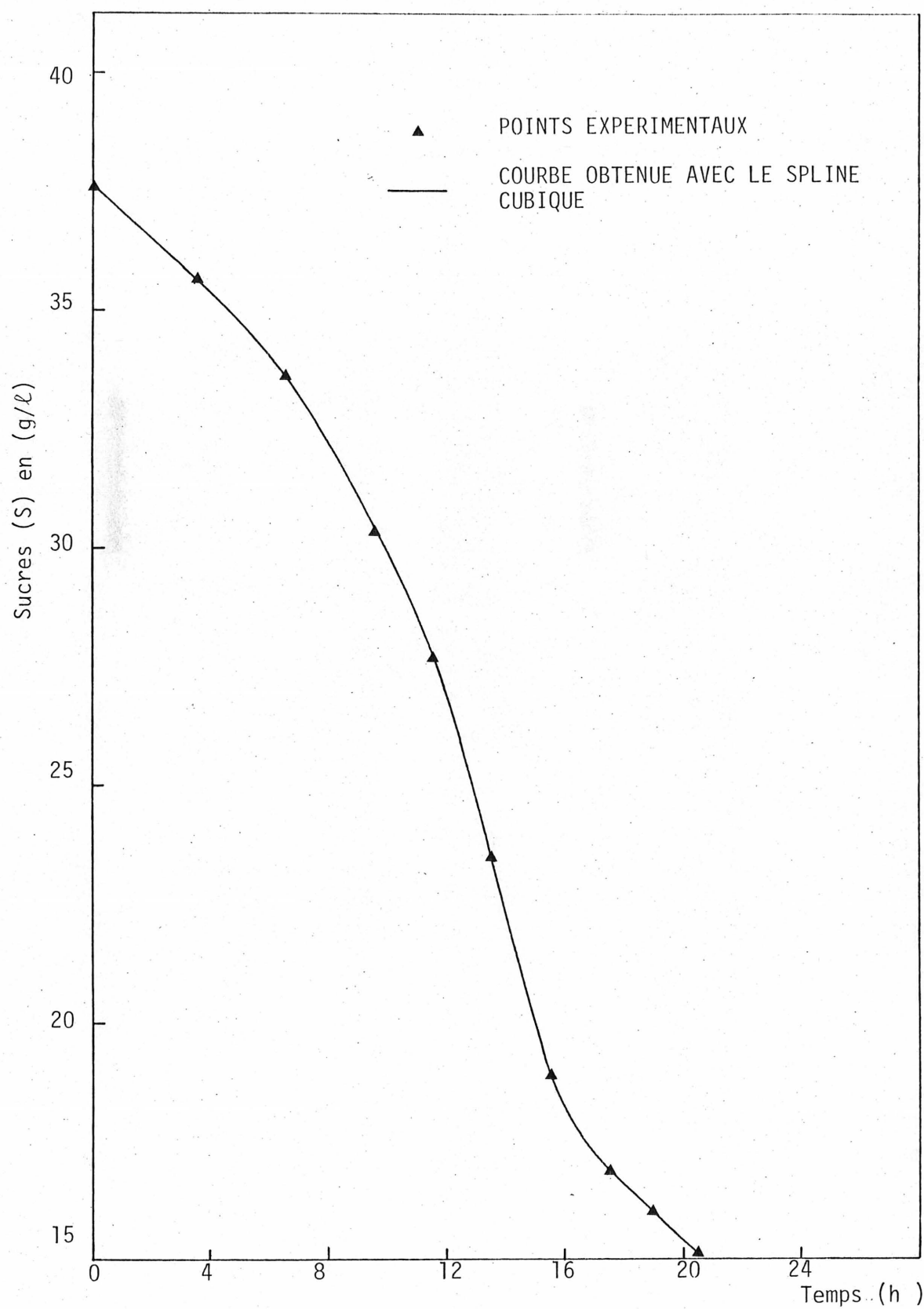
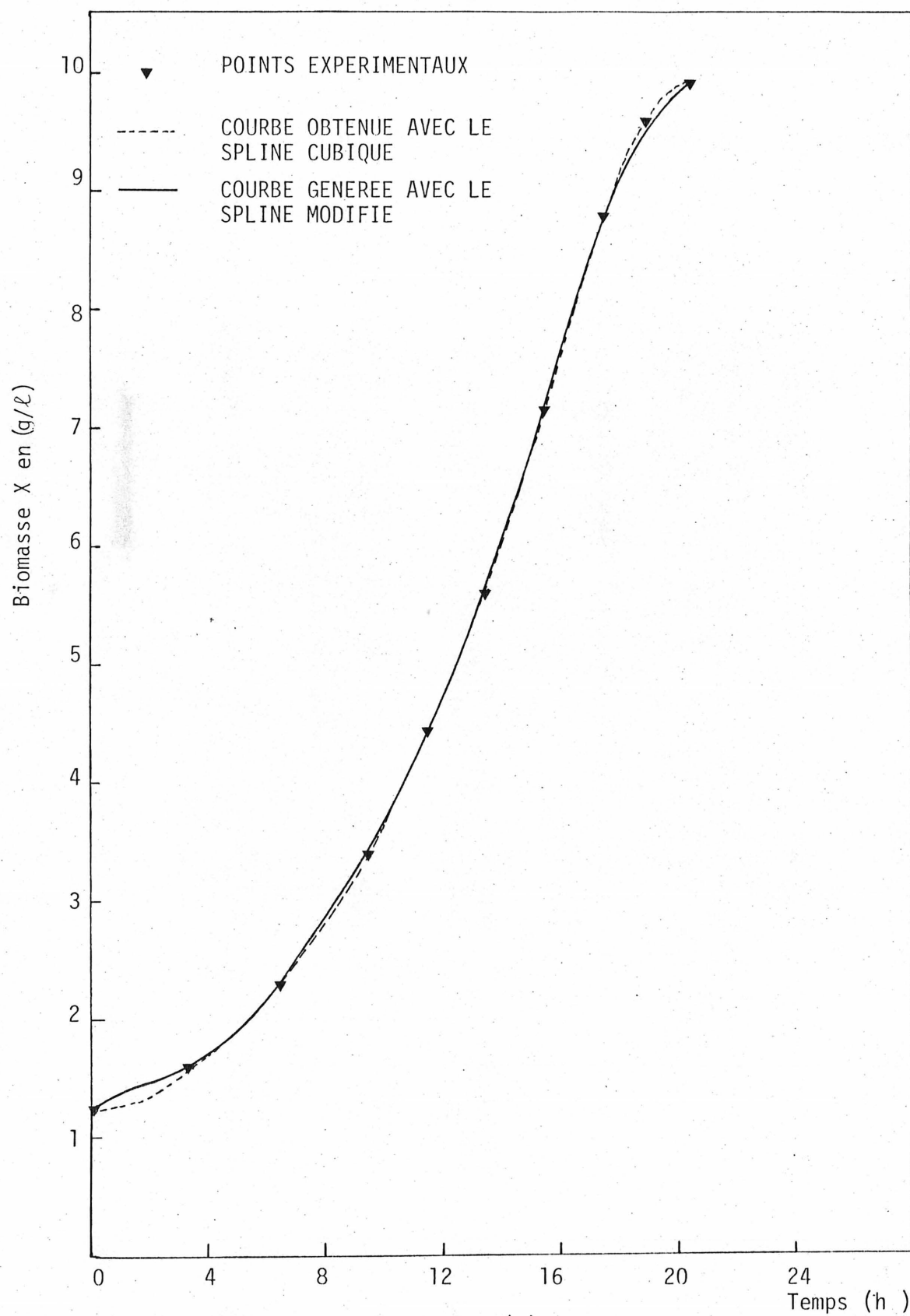


FIGURE 28: CALCUL DE LA DERIVEE PREMIERE DE $X(t)$ POUR FB1

FIGURE 29: LISSAGE DE $S(t)$ POUR FB2

FIGURE 30: LISSAGE DE $X(t)$ POUR FB2

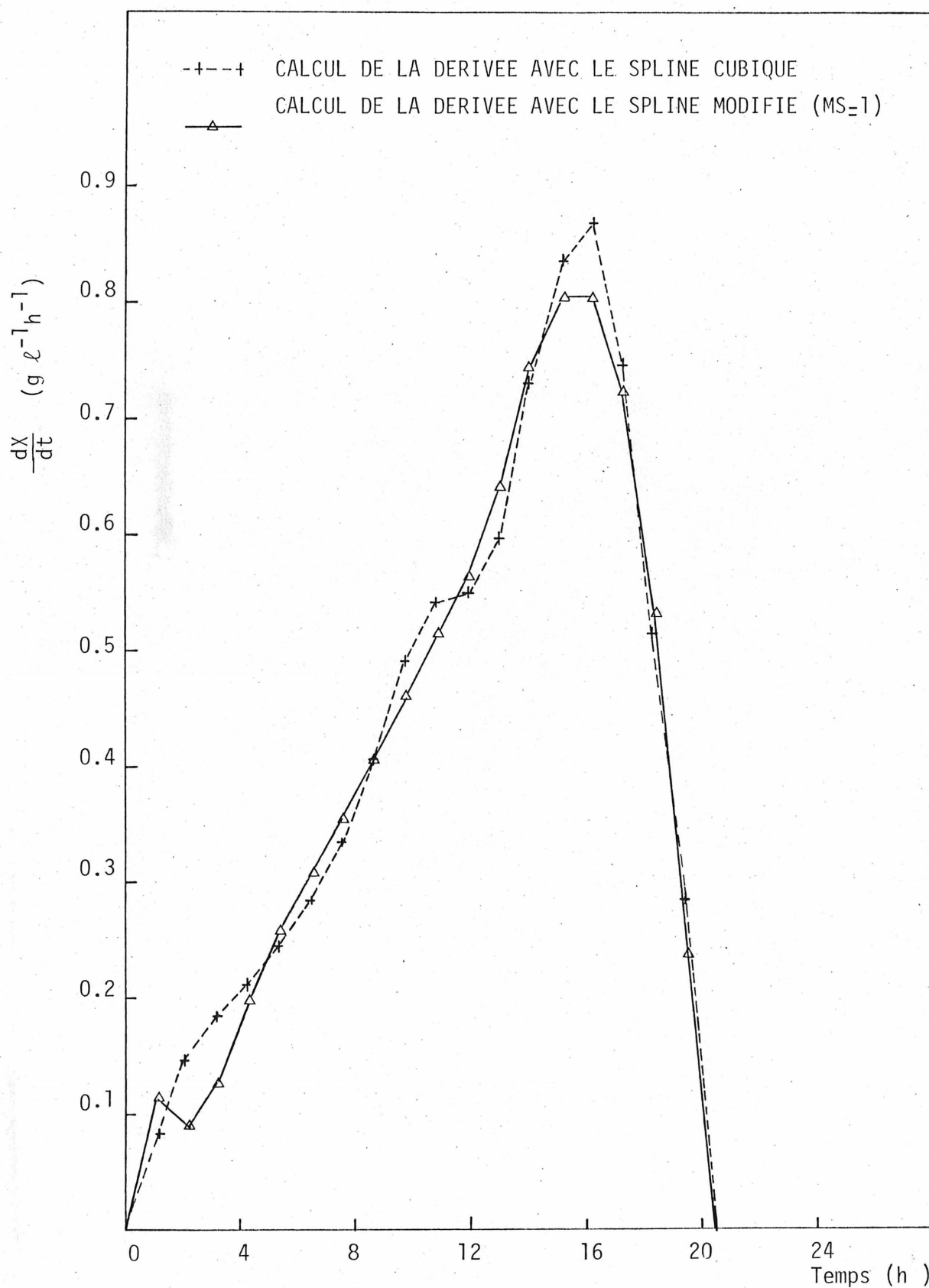


FIGURE 31: CALCUL DE LA DERIVEE PREMIERE DE X(t) POUR FB2

Remarque:

Dans la méthode du spline cubique, il est nécessaire de spécifier deux conditions pour être en mesure de résoudre le système d'équations algébriques⁽¹⁾. Nous avons dans un premier essai, utilisé $y''(x_1) = y''(x_n) = 0$ comme conditions additionnelles. Mais la dérivée première étant nulle en fin de fermentation, nous avons modifié la méthode avec $y'(x_1) = y'(x_n) = 0$. Ceci nous a donné des résultats pratiquement identiques dans les deux cas.

7.2.2 Obtention des paramètres du modèle de MONOD.

Nous avons vu précédemment que les paramètres du modèle de MONOD sont obtenus en lissant la droite d'équation.

$$\frac{1}{\mu} = \left(\frac{K_s}{\mu_{\max}} \right) \frac{1}{S} + \frac{1}{\mu_{\max}}$$

Le lissage est réalisé en utilisant la méthode des moindres carrés (voir annexe B). Avant d'effectuer celui-ci, nous avons:

1. déduit la quantité de sucres non assimilables de la quantité de sucres résiduels. En effet, dans le modèle de MONOD, S exprime la concentration résiduelle de sucres fermentescibles. En effet, la concentration de sucres mesurée est la concentration en sucres totaux.

2. Ecarté les premiers points qui sont représentatifs de la phase de latence, celle-ci n'est pas prise en compte par le modèle de MONOD.

Nous obtenons aussi les résultats suivants:

	μ_{\max}	K_s
FB1	0.132	0.136
FB2	0.129	0.457

Les résultats confirment les constatations que nous avons effectuées précédemment; en effet, le tracé de $\text{Log}_{10} X(t)$, nous avait montré que le taux de croissance était maximum et égal à 0.13h^{-1} tout au long de la phase exponentielle; c'est à dire que K_s était petit devant la concentration en sucre.

7.2.3 Intégration des équations différentielles du modèle de MONOD.

Afin d'établir une comparaison avec les valeurs expérimentales, nous avons intégré le système d'équations différentielles suivant:

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{\max} \frac{SX}{K_s + S}$$

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{1}{Y} \frac{dX}{dt}$$

On obtient alors $X(t)$ et $S(t)$. Mais pour pouvoir réaliser cette intégration, le rendement doit être connu.

Y est défini comme le rapport de la quantité de biomasse produite ΔX et de la quantité de sucre consommé. Dans le modèle de MONOD, ce terme est considéré constant tout au long de la fermentation. Nous avons, en ce qui concerne FB1 et FB2, estimé le rendement de façon globale. On obtient ainsi une valeur de 0.38.

L'intégration a été réalisée par l'intermédiaire de la méthode de RUNGE-KUTTA-MERSON d'ordre 4 ⁽⁴⁾. Le programme utilisé se trouve à l'annexe B. Les résultats obtenus en utilisant les paramètres calculés précédemment sont montrés aux figures 32 et 33.

7.2.4 Résultats et discussion.

Nous constatons dans les deux cas que les courbes calculées

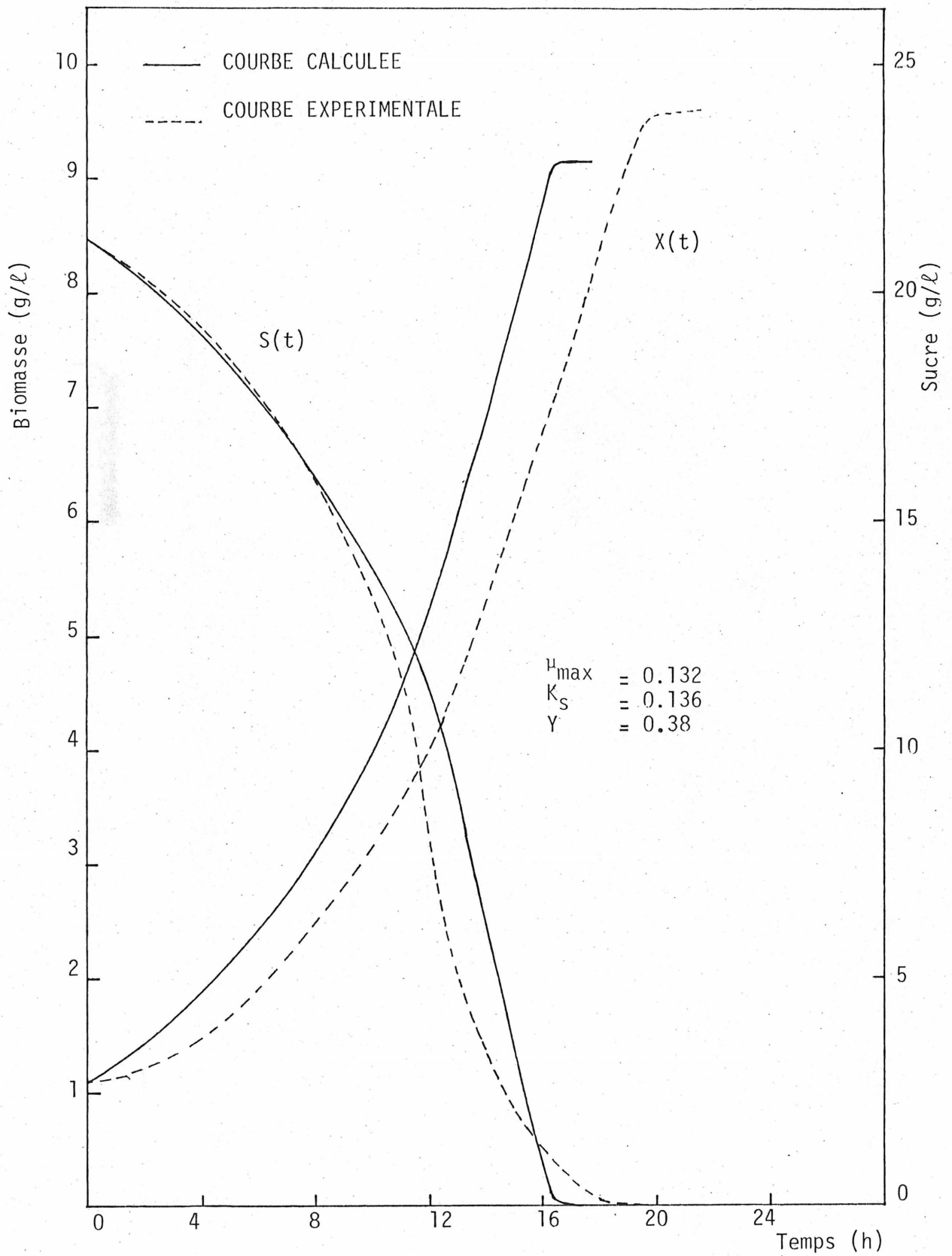


FIGURE 32: INTEGRATION DES EQUATIONS DU MODELE DE MONOD (FB1)

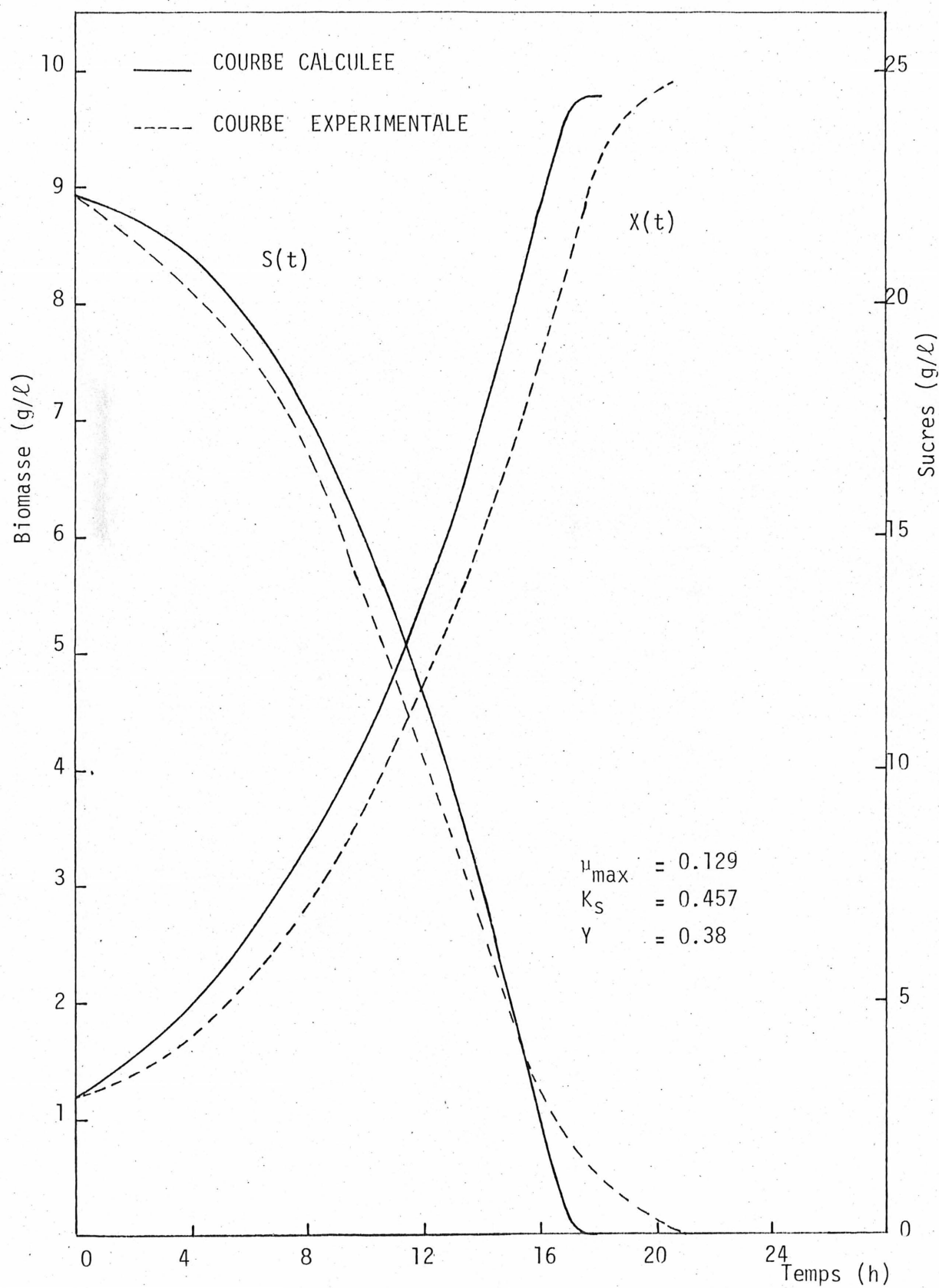


FIGURE 33: INTEGRATION DES EQUATIONS DU MODELE DE MONOD (FB2)

sont nettement distinctes des courbes expérimentales. Plusieurs raisons peuvent être données pour expliquer cet écart. Tout d'abord la méthode que nous utilisons doit calculer les dérivées de $X(t)$. Cette estimation comporte une certaine erreur du fait que chaque variation sur $X(t)$ est amplifiée au niveau de la dérivée. D'autre part nous avons écarté les premiers points (ceux appartenant à la phase de latence) pour estimer nos paramètres. Ceci était justifié par le fait que la phase de latence n'était pas très importante comme le montre le tracé de $\log_{10} X = f(t)$ (voir figure 21). Mais ceci induit tout de même un écart.

Mais la plus grosse erreur provient du fait que nous avons supposé le rendement constant tout au long de la fermentation. En effet, si l'on calcule le rendement instantané $Y = - \frac{dX/dt}{dS/dt}$ (le calcul est fait à partir des résultats lissés précédemment), tout au long de la fermentation, on constate facilement que l'hypothèse du modèle de MONOD n'est pas vérifiée (voir figure 34). L'examen de la variation du rendement instantané en fonction du temps montre que nous obtenons deux périodes pendant la fermentation. De 0 à 12 h, le rendement est de l'ordre de 25-30%. Après un creux à environ 12h de fermentation, le rendement remonte brutalement. Pour expliquer ceci, l'hypothèse d'un autre substrat que le sucre a été envisagée. Ainsi, dans la première phase, Candida utilis consommerait essentiellement des sucres. Par la suite d'autres composés carbonés seraient métabolisés après une période adaptative pendant laquelle le rendement baisserait légèrement. ($t = 12h$). L'augmentation finale serait due à l'utilisation d'un autre substrat.

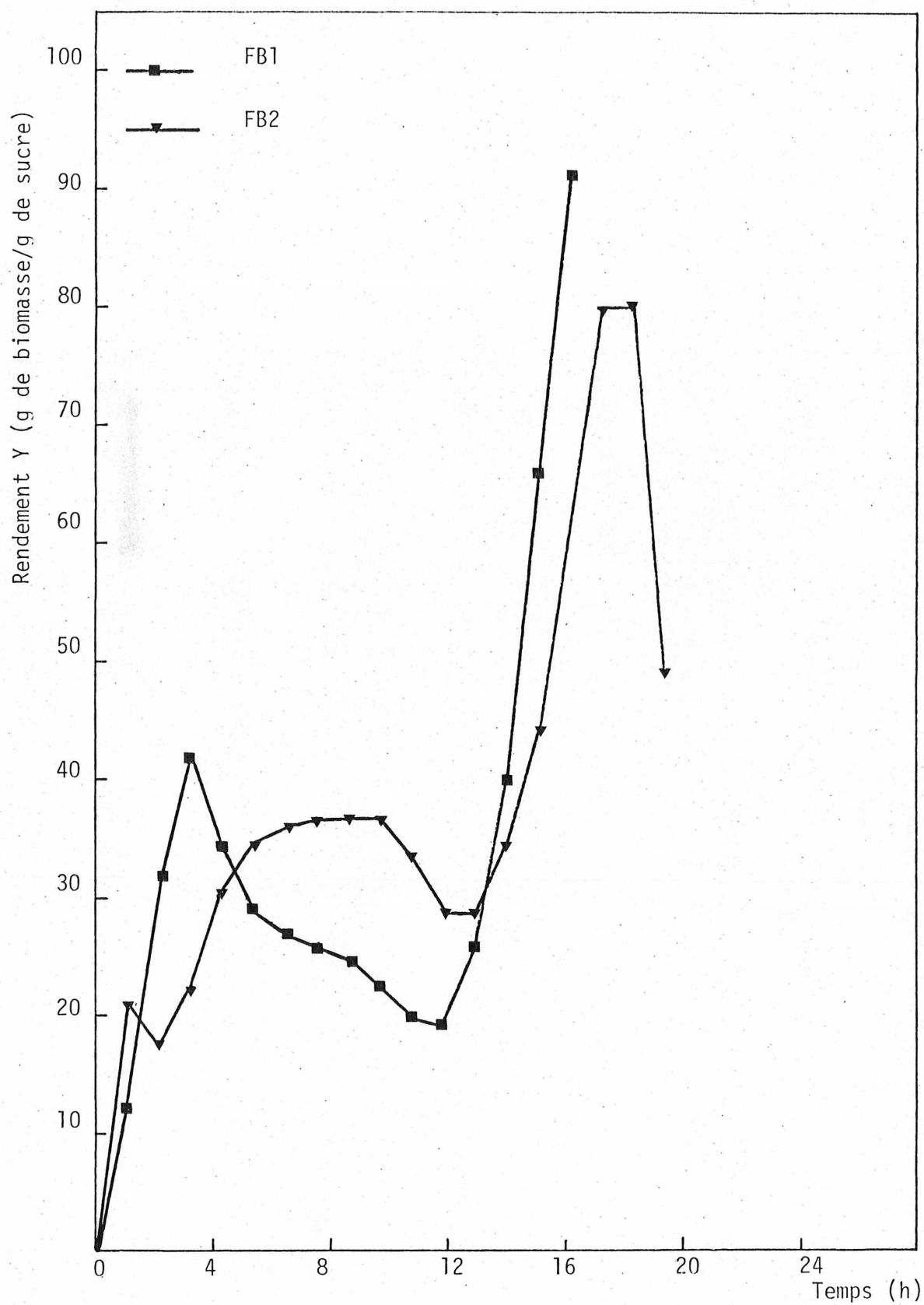


FIGURE 34: RENDEMENT INSTANTANÉ EN FONCTION DU TEMPS

7.3. Calcul des paramètres de MONOD par une méthode directe.

7.3.1 Introduction.

Dans le but d'éviter le calcul de la dérivée de $X(t)$ et aussi de prendre en compte tous les points, nous avons utilisé une méthode directe d'obtention des paramètres.

7.3.2 Méthode utilisée.

Elle consiste à rechercher les paramètres en minimisant la fonction erreur ainsi formulée.

$$F = \sum_{i=1}^n (S_{\text{cal}} - S_{\text{exp}})_i^2 + \sum_{i=1}^n (X_{\text{cal}} - X_{\text{exp}})_i^2$$

La minimisation de F est effectuée par la méthode de Powell (23,24). A chaque évaluation de la fonction objective, le calcul de S_{cal} et X_{cal} nécessite l'intégration des équations différentielles (2 et 3). Celle-ci est réalisée par la méthode de Runge-Kutta-Merson d'ordre 4. Le programme utilisé ⁽⁷⁾ est joint à l'annexe B.

7.3.3 Résultats et discussion.

En utilisant comme estimé de départ, les valeurs des paramètres trouvées précédemment, nous avons obtenu les résultats suivants:

Parametres Fermentation	μ_{\max}	K_s	Y	F	F*
FB1	0.136	0.176	0.359	82.2	169.4
FB2	0.116	0.188	0.377	17.1	116.8

où F^* est la valeur de F calculée avec les estimés de départ. On constate que pour FB1, les valeurs des paramètres n'ont pas variées beaucoup par rapport à celles obtenues précédemment. Par contre pour FB2, la seconde méthode a diminué le taux de croissance maximum μ_{\max} ainsi la constante de saturation K_s . Pour cette fermentation les résultats obtenus sont satisfaisants comme le montre l'intégration des équations différentielles 2 et 3 (voir figure 36). En ce qui concerne FB1, l'amélioration n'a pas été très nette (voir figure 35). Parmi les hypothèses émises précédemment (voir paragraphe 7.2.4), deux restent encore plausibles pour expliquer l'écart avec les valeurs expérimentales.

- une phase de latence importante;
- un rendement variable.

Ainsi pour mettre en évidence l'importance de la phase de latence, deux essais ont été réalisés.

Le premier test consistait à supprimer le 1er point expérimental ($t=0$). La figure 37 montre les résultats obtenus. En ce qui concerne $X(t)$, le lissage est correct mais il en n'est pas de même pour $S(t)$. D'autre part, les valeurs finales des paramètres ($\mu_{\max} = 0.143$, $K_s = 1,239$, $Y = 0.4258$ et $F = 136.4$) sont considérablement augmentées par rapport à celles obtenues précédemment. Il semble donc que la phase de latence ne soit pas la cause de l'écart avec les points expérimentaux. D'ailleurs un autre test a été réalisé le premier point est laissé flottant, c'est-à-dire que l'on introduit deux nouveaux paramètres $S(t=0)$ et $X(t=0)$. Nous avons obtenu des résultats ($\mu_{\max} = 0.4073$, $K_s = 9.687$, $Y = 0.3925$, $X(t=0) = 0.22$, $S(t=0) = 20.30$) qui ne sont pas améliorés par rapport aux précédents puisque la valeur de la fonction est de 105.40.

Comme le rendement change au cours de la fermentation, nous avons essayé de rendre compte de cette variation en exprimant celui-ci de la façon suivante:

$$Y = AX^2 + BX + C.$$

Nous introduisons alors trois paramètres A,B,C. On obtient

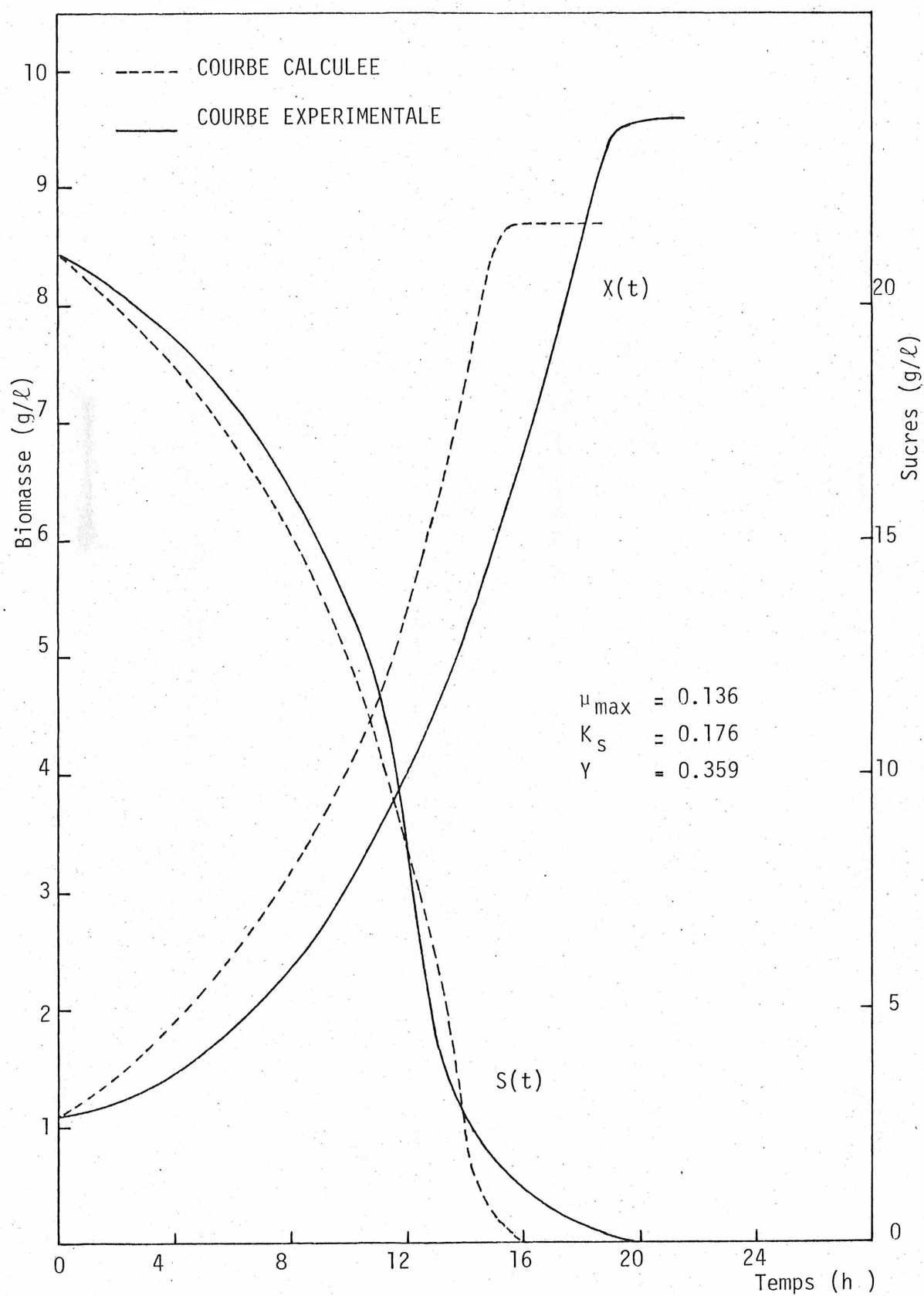


FIGURE 35: LISSAGE DES CINETIQUES DE FB1 PAR LA METHODE DIRECTE

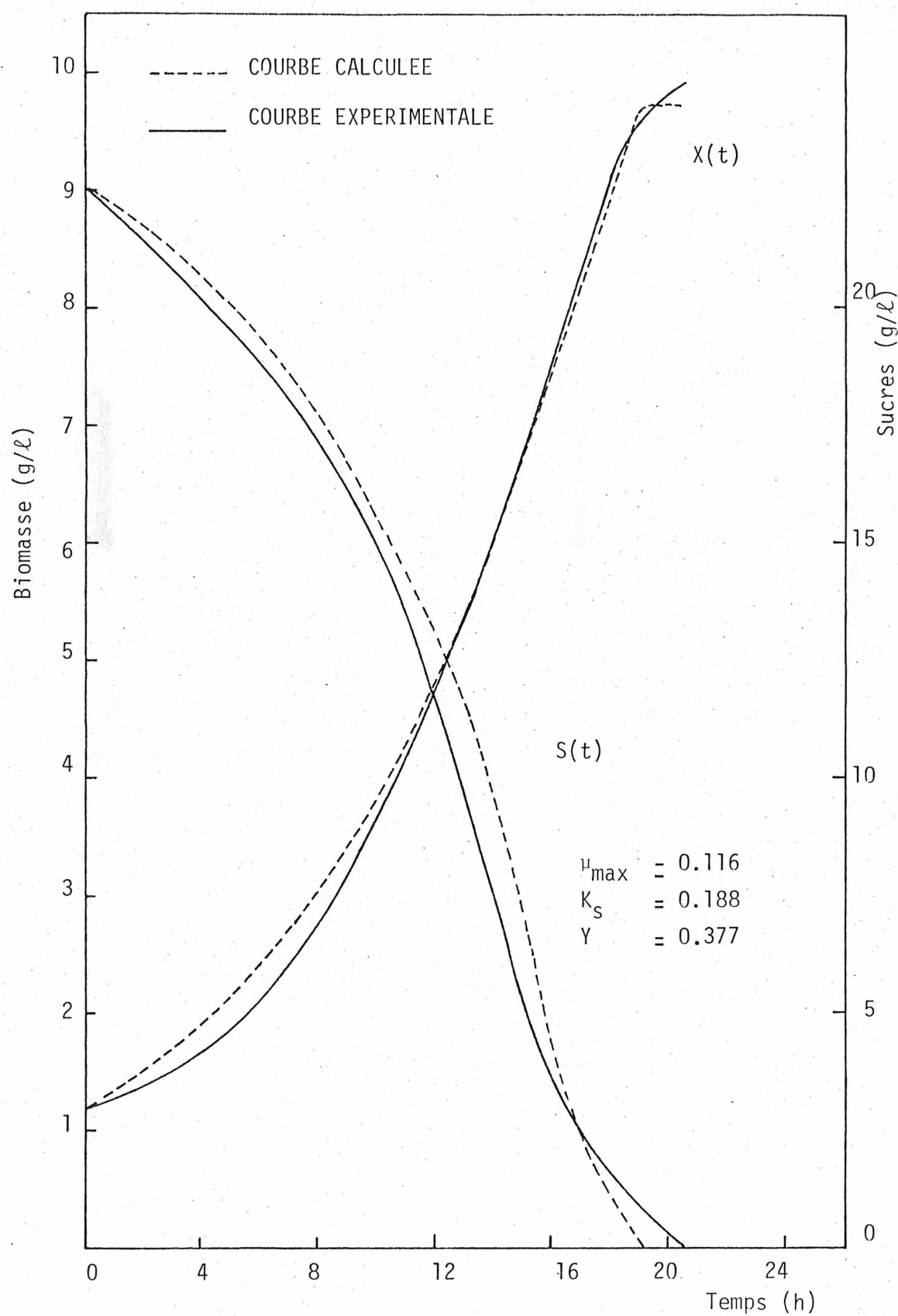


FIGURE 36: LISSAGE DES CINETIQUES DE FB2 PAR LA METHODE DIRECTE

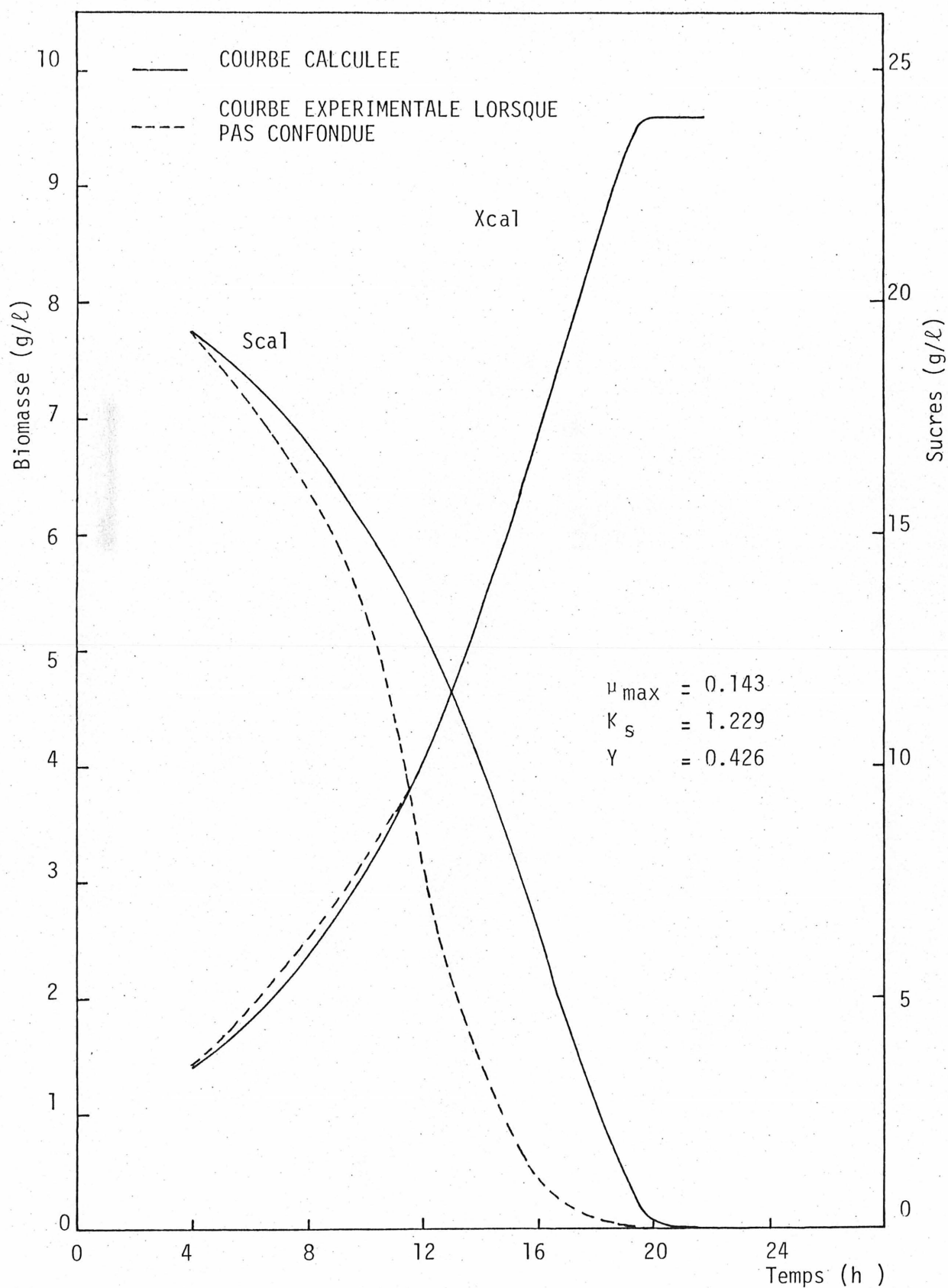


FIGURE 37: LISSAGE DES CINETIQUES DE FB1
SANS UTILISER LE 1er POINT EXPERIMENTAL

ainsi:

$$\mu_{\max} = 0.147 \quad K_s = 3.99 \quad A = -0.0001 \quad B = -222. \quad C = 0.939$$

La fonction erreur est de 85.6. On constate que celle-ci reste toutefois importante. L'expression proposée pour le rendement n'est pas adéquate. Le lissage des données expérimentales pourrait être amélioré par l'utilisation d'une cubique. Mais, ceci augmente encore le nombre de paramètres du modèle; en fait, il apparaît que la variation du rendement est probablement due à l'utilisation d'un autre substrat que le sucre; il serait donc plus pertinent d'identifier cet autre substrat. Nous pourrions ainsi utiliser un modèle à deux substrats qui nous permettrait de mieux lisser les résultats obtenus.

CONCLUSION

Il ressort de cette étude que la tourbe, après une hydrolyse acide peut conduire à une liqueur riche en composés fermentescibles (principalement en sucre). Le rendement d'extraction des sucres est très important puisque nous obtenons une extraction maximum de 280 mg de sucres par g de tourbe sèche traitée, et ceci pour un temps de contact de 1h à 150°C.

La liqueur obtenue montre des carences en azote et en phosphore vis-à-vis de la croissance de Candida utilis. L'addition d'ammoniaque et de phosphate augmente la croissance de 130%. La culture, dans un réacteur fortement agité et aéré, où le pH et la température sont respectivement régulés à 5 et 30°C, conduit à une biomasse de 8.5 g/l pour une concentration initiale de sucre d'environ 35 g/l. Seulement 55% de ceux-ci sont fermentescibles. Le rendement calculé par rapport aux sucres consommés est de l'ordre de 40%. L'étude de la fermentation en régime continu, montre que le taux de dilution maximum est de 0.125h^{-1} . On obtient alors une productivité de $1.24\text{ g l}^{-1}\text{h}^{-1}$.

La modélisation des cinétiques de croissance a montré que les paramètres du modèle de MONOD permettaient une meilleure compréhension des cinétiques de croissance. La confirmation de l'hypothèse émise quant à l'utilisation d'un autre substrat que le sucre peut

être envisagée. Ceci permettrait d'établir un modèle qui pourrait
lisser, d'une façon plus satisfaisante, les résultats expérimentaux.

ANNEXE A

CANDIDA UTILIS⁽¹⁴⁾

1. Le genre Candida.

Le genre Candida est placé dans le groupe des levures dites asporogènes, c'est-à-dire celles dont la reproduction sexuelle n'a pas été observée et qui ne forment aucun ballistospores. C'est un groupe assez hétérogène. Ces levures, du genre Candida, ne possèdent pas les propriétés ou groupe de propriétés nécessaires pour les classer dans les autres genres.

Ainsi on remarque pour "Candida", l'absence de:

- formation de ballistospores;
- absence de fermentation et de pseudo-mycelium bien développé;
- formation de cellules en forme de bouteille par bourgeonnement unipolaire et absence de fermentation;
- reproduction intermédiaire entre le bourgeonnement et la fission;
- formation d'endospores et d'un bourgeonnement à large base combiné avec la fission;
- formation de cellules ou forme d'ogives et production d'acide acétique;
- formation de cellules triangulaires;
- fermentation et formation de cellules pointues, avec bourgeonnement bipolaire;

- formation de pigments de caratenoïde visibles distinctement et absence de fermentation;
- formation d'un vrai mycelium et d'arthrospores;
- formation de cellules reliées par des tubes étroits.

Le diagnostic du genre Candida est le suivant:

Les cellules sont globulaires, avoïdes, cylindriques ou allongées, quelquefois de forme irrégulière.

La reproduction se fait normalement par bourgeonnement multipolaire; les cellules qui bourgeonnent de façon bipolaire n'ont pas un bourgeon à large base.

Toutes ou presque toutes les souches forment un pseudo-mycelium. Celui-ci est souvent différencié en pseudo-hyphae et blastospores. Des chlamydospores et un vrai mycelium peuvent être formés. Les arthrospores sont absents. Les ascospores, teliospores ou ballistospores ne sont pas formés. La pigmentation due à la caraténoïde n'est pas visible. Des polysaccharides extracellulaires peuvent être formés et peuvent donner une réaction à l'iode positive. La fermentation alcoolique s'effectue dans beaucoup d'espèces.

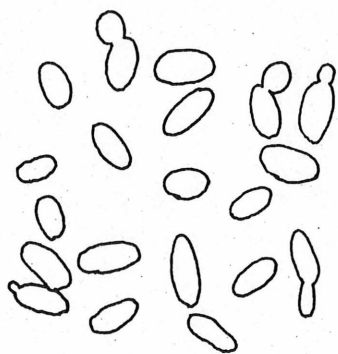
2- Morphologie de Candida utilis.

Croissance sur milieu de glucose- extrait de levure- peptone.

Après trois jours à 25⁰C, les cellules sont de forme ovoïde à cylindrique (3.5 μ - 4.5 μ) x (7 μ - 13 μ). Un fin anneau peut être présent (voir figure suivante).

Croissance sur glucose - extrait de levure - peptone agar.

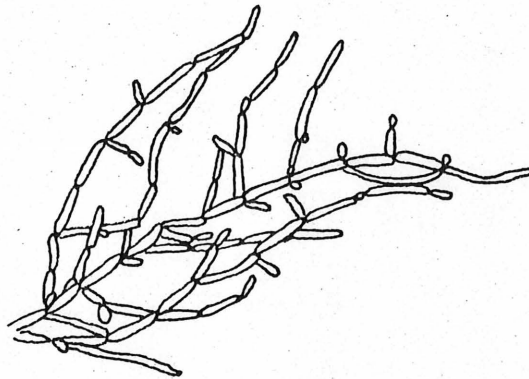
Après un mois à 25⁰C, la culture est de couleur crème, semi-mate ou plus rarement brillante, uniforme dans la plupart des souches, finement ponctuée dans quelques autres.



Candida utilis (forme unicellulaire)

Croissance sur farine de maïs - agar.

Un pseudo-mycelium est abondamment formé. Il est constitué de chaînes branchées courtes et de cellules ovoides (voir figure suivante).



Candida utilis: (forme pseudo-mycelliënne)

Reproduction: La reproduction se fait par bourgeonnement multipolaire.

3- Physiologie de Candida utilis.

Le tableau 15 montre les principales caractéristiques de Candida utilis. On remarque que Candida utilis utilise de nombreux composés carbonés. A l'encontre de beaucoup de levures, elle dégrade les pentoses (en particulier xylose). Ceci est intéressant quant à l'utilisation industrielle de C. utilis. Comme source d'azote, C. utilis pré-

sente la propriété d'utiliser l'ammoniaque, l'urée, quelques acides amines (asparagine) et les ions ammonium. Elle présente de plus l'intérêt de métaboliser les nitrates. En ce qui concerne les sources de soufre, Candida utilis pousse bien si les sulfates sont remplacés par les sulfites, thiosulphates, glutanione, methionine, cysteine.

Candida utilis prolifère bien aérobiquement à 30°C avec un rendement approximatif de 50 g de cellules sèches pour 100 g de glucose. La température maximale de croissance est de 33-40°C, la température minimale de 5-10°C. Le pH initial est généralement ajusté à 4.5 dépendant du substrat utilisé et des conditions de fermentation. La croissance s'effectue bien dans la gamme de pH de 4-5. De plus Candida utilis résiste bien à de fortes concentrations salines; sa tolérance au chlorure de sodium est de 6% à 8% (poids/volume)

TABLEAU 15

CARACTERISTIQUES PHYSIOLOGIQUES DE C. UTILIS

FERMENTATION:

Glucose +	Lactose -
Galactose -	Melibiose -
Sucrose +	Raffinose +
Maltose -	Melezitose -
Cellobiose -	Inulin weak or -
Trehalose -	

ASSIMILATION OF CARBON COMPOUNDS:

Glucose +	D-Ribose -
Galactose -	L-Rhamnose -
L-Sorbose -	Ethanol+ Or weak
Sucrose +	Glycerol +
Maltose +	Erythritol -
Cellobiose +	Ribitol -
Trehalose +or weak	Galactitol -
Lactose -	D-Mannitol+ or weak or -
Melibiose -	D-Glucitol -
Raffinose +	α -Methyl-D-glucoside +or weak
Melezitose +	Salicin +
Inulin +	DL-Lactic acid +
Soluble starch -	Succinic acid +or weak
D-Xylose +or weak	Citric acid +
L-Arabinose -	Inositol -
D-Arabinose -	

ANNEXE B

PROGRAMMES "FORTRAN" UTILISÉS

PROGRAMME 1

sous-programme "SPIFIT"

- lissage et interpolation des résultats expérimentaux
- calcul de la dérivée première

PROGRAMME 2

Lissage d'une droite par la méthode des moindres carrés.

PROGRAMME 3

Obtention des paramètres du modèle de MONOD sur
minimisation directe de la fonction erreur.

```

1      IMPLICIT REAL*8(A-H,O-Z)
2      DIMENSION X(50),Y(50),YL(50),DYDT(50),DYDTY(50),XL(50)
3      READ(5,100) N,NI
4      100 FORMAT(2I10)
5      READ(5,101) NU
6      101 FORMAT(I10)
7      READ(5,* ) (X(I),I=1,N)
8      READ(5,* ) (Y(I),I=1,N)
9      WRITE(6,19)
10     19 FORMAT('1',50X,'VALEURS EXPERIMENTALES',//)
11     WRITE(6,150) (X(I),Y(I),I=1,N)
12     150 FORMAT(51X,2F10.4)
13     MS=0
14     17 WRITE(6,103) MS
15     103 FORMAT(///,30X,'LE FACTEUR DE LISSAGE MS = ',I3,/)
16     CALL SPIFIT (N,MS,NI,X,Y,XL,YL,DYDT,DYDTY)
17     IF (MS,EQ,NU) GO TO 18
18     MS=MS+1
19     GO TO 17
20     18 STOP
21     END

22     SUBROUTINE SPIFIT(N,MS,NI,X,Y,XL,YL,DYDT,DYDTY)
23     IMPLICIT REAL*8(A-H,O-Z)
24     DIMENSION X(NI),Y(NI),YL(NI),DYDT(NI),DYDTY(NI),XL(NI)
25     DIMENSION S(20),H(50),T(50),D(50),F(50)
26     DIMENSION FH(50),HHF(50)
27     IF (MS,EQ,0) GO TO 10
28     C ADDITION DE DEUX POINTS SUPPLEMENTAIRES POUR LE LISSAGE
29     X(N+2)=X(N)
30     Y(N+2)=Y(N)
31     DO 5 I=3,N
32     L=N+3-I
33     5 Y(L)=Y(L-1)
34     N=N+2
35     X(2)=X(1)+.1*(X(3)-X(1))
36     X(N-1)=X(N)-.1*(X(N)-X(N-2))
37     C LISSAGE DES POINTS EXPERIMENTAUX AVEC UNE QUADRATIQUE
38     C PAR LA METHODE DES MOINDRES CARRES
39     DO 15 I=1,MS
40     Y(2)=Y(1)+.1*(Y(3)-Y(1))
41     Y(N-1)=Y(N)-.1*(Y(N)-Y(N-2))
42     K=N-2
43     DO 15 J=3,K
44     DO 25 L=1,7
45     25 S(L)=0.0
46     DO 30 L=1,5
47     30 LI=L-3
48     D1=X(J+LI)-X(J)
49     D2=Y(J+LI)
50     S(1)=S(1)+D1
51     DFUX=D1*D1
52     S(2)=S(2)+DEUX
53     TROIS=DEUX*D1
54     S(3)=S(3)+TROIS
55     S(4)=S(4)+TROIS*D1
56     S(5)=S(5)+DEUX*D2

```

```

55      S(6)=S(6)+D2
56      30 S(7)=S(7)+D1*D2
      C   SI S(1)=0 ,LES POINTS SONT EGALEMENT ESPACES , ON VA DIRECTEMENT
      C   EN 35 ,DANS LE CAS CONTRAIRE ,ON CONTINUE
57      IF (S(1).EQ.0) GO TO 35
58      S2=(5.*S(2)-S(1)*S(1)) *(S(2)*S(3)-S(1)*S(4))-(5.*S(3)-S(1)*S(2))
      1 *(S(2)*S(2)-S(1)*S(3))
59      S1=(S(5)*S(1)-S(6)*S(3))*(S(2)*S(2)-S(1)*S(3))-(S(1)*S(7)-S(2)
      1*S(6))*(S(2)*S(3)-S(1)*S(4))
60      Y(J)=S1/S2
61      GO TO 15
62      35 Y(J)=(-3.*Y(J-2)+12.*Y(J-1)+17.*Y(J)+12.*Y(J+1)-3.* Y(J+2))/35.
63      15 CONTINUE
      C   DEBUT DE L'INTERPOLATION PAR LE SPLINE CUBIQUE
64      10 N1=N-1
65      N2=N-2
      C   DETERMINATION DES COEFFICIENTS DU SYSTEME TRIDIAGONAL
      C   PAR LE SOUS-PROGRAMME TRIDAG
66      DO 20 I=1,N1
67      20 H(I)=X(I+1)-X(I)
68      F(1)=3.*(Y(2)-Y(1))/(H(1)*H(1))
69      F(N)=-3.*(Y(N)-Y(N-1))/(H(N-1)*H(N-1))
70      HH(1)=0.
71      HH(N)=0.5
72      T(1)=1.
73      T(N)=1.
74      HHH(1)=0.5
75      HHH(N)=0.0
76      DO 40 I=2,N1
77      HH(I)=H(I-1)
78      HHH(I)=H(I)
79      T(I)=2.*(H(I)+H(I-1))
80      40 F(I)=6.*((Y(I+1)-Y(I))/H(I)-(Y(I)-Y(I-1))/H(I-1))
81      CALL TRIDAG(I,N,HH,T,HHH,F,D)
      C   INTERPOLATION DE LA FONCTION ET DE SA DERIVEE POUR NI POINTS
82      WRITE(6,56)
83      56 FORMAT(50X,' VALEURS LISSEES ET DERIVEES ',//,52X,'X',14X,'Y',12X,
      1'DY/DX',3X,'(1/Y)*(DY/DX)',/)
84      NU=NI-1
85      DX=(X(N)-X(1))/NU
86      I=1
87      DO 55 J=1,NI
88      R1=(J-1)*DX+X(1)
89      65 IF (I.EQ.N-1) GO TO 60
90      IF (R1.LT.X(I+1)) GO TO 60
91      I=I+1
92      GO TO 65
93      60 D2=D(I)*(X(I+1)-R1)**3+D(I+1)*(R1-X(I))**3+(R1-X(I))*(6.*Y(I+1)
      1-D(I+1)*H(I)**2)+(X(I+1)-R1)*(6.*Y(I)-D(I)*H(I)**2)
94      D2 =D2/(6.*H(I))
95      D3=-3.*D(I)*(X(I+1)-R1)*(X(I+1)-R1)+3.*D(I+1)*(R1-X(I))*(R1-X(I))
      2 +6.*(Y(I+1)-Y(I))-H(I)*H(I)*(D(I+1)-D(I))
96      D3 =D3/(6.*H(I))
97      DYDTY(J)=D3/D2
98      XL(J)=R1
99      YL(J)=D2
100     DYDT(J)=D3
101     55 WRITE(6,104)J,XL(J),YL(J),DYDT(J),DYDTY(J)
102     104 FORMAT(30X,I10,4F15.4)
103     RETURN

```

```
104      END
105      SUBROUTINE TRIDAG(IF,L,A,B,C,D,V)
106      IMPLICIT REAL*8(A-H,O-Z)
107      DIMENSION A(50),B(50),C(50),D(50),V(50),BETA(101),GAMMA(101)
108      BETA(IF)=B(IF)
109      GAMMA(IF)=D(IF)/BETA(IF)
110      IFP1=IF+1
111      DO 1 I=IFP1,L
112      BETA(I)=B(I)-A(I)*C(I-1)/BETA(I-1)
113      1 GAMMA(I)=(D(I)-A(I)*GAMMA(I-1))/BETA(I)
114      V(L)=GAMMA(L)
115      LAST=L-IF
116      DO 2 K=1,LAST
117      I=L-K
118      2 V(I)=GAMMA(I)-C(I)*V(I+1)/BETA(I)
119      RETURN
120      END
```

PROGRAMME 2

\$JOB QUIERZY,LIST

```

1      IMPLICIT REAL*8(A-H,C-Z)
2      DIMENSION X(20),Y(20)
3      READ(5,100) N
4      100  FORMAT(I2)
5      READ(5,*) (X(I),I=1,N)
6      READ(5,*) (Y(I),I=1,N)
7      WRITE(6,200)N,((I,X(I),Y(I),I=1,N)
8      200  FORMAT(/10X,'N = ',I2//,(10X,'I = ',I2,5X,'X = ',F5.2,5X,'Y = ',
      1F5.2))
9      SX=0.
10     SY=0.
11     SXY=0.
12     SX2=0.
13     DO 2 I=1,N
14     SX=SX+X(I)
15     SY=SY+Y(I)
16     SX2=SX2+X(I)**2
17     2    SXY=SXY+X(I)*Y(I)
18     FN=N
19     D=FN*SX2-SX**2
20     A=(FN*SXY-SX*SY)/D
21     B=(SX2*SY-SX*SXY)/D
22     WRITE(6,201) A,B
23     201  FORMAT(/10X,'A = ',E12.5,5X,'B = ',E12.5)
24     DO 3 I=1,N
25     EPS=Y(I)-(A*X(I)+B)
26     FPS=EPS*EPS
27     SCE=0.
28     3    SCE=SCE+EPS
29     WRITE(6,202) SCE
30     202  FORMAT(/10X,'SCE = ',E12.5)
31     STOP
32     END

```

\$ENTRY

N = 11

I = 1	X = 0.06	Y = 7.67
I = 2	X = 0.06	Y = 7.69
I = 3	X = 0.07	Y = 7.78
I = 4	X = 0.08	Y = 7.90
I = 5	X = 0.12	Y = 7.95
I = 6	X = 0.19	Y = 7.75
I = 7	X = 0.27	Y = 7.38
I = 8	X = 0.48	Y = 7.52
I = 9	X = 1.10	Y = 8.61
I = 10	X = 2.61	Y = 10.83
I = 11	X = 7.42	Y = 15.06

A = 0.10281D 01 B = 0.75766D 01

L'ISSAGE DES CINETIQUES DE CROISSANCE PAR LE MODELE DE MONOD
MAR 29, 1976 PAGE 1

```

      IMPLICIT REAL*8(A-H,D-Z)
      COMMON/FDBJ/T(30),U(30),V(30),CDEF(10),NCDEF,NPTS
      COMMON/MIUMIU/A(144),B(144)
      DIMENSION X(10),W(100),E(10), IFMT(20)
9      READ(5,007,END=999) IFMT
      WRITE(6,IFMT)
      READ(5,005) NPTS,NCDEF
      READ(5,005) N, IPRINT, MAXIT, ESCALE
005  FORMAT(3I10,2G10.5)
      READ(9,*) (X(II),II=1,N)
C 006  FORMAT(5G15.5)
      READ(5,*) (E(JJ),JJ=1,N)
      IF(NPTS.NE.0) READ(5,*) (T(I),U(I),V(I),I=1,NPTS)
      IF(NCDEF.NE.0) READ(5,011) (CDEF(I),I=1,NCDEF)
      NW = N * (N+3)
      CALL BOTM (X,E,N,EF,ESCALE,IPRINT,MAXIT,W,NI,NO,NW)
      WRITE(6,001)
001  FORMAT (//,5X,'VALEUR FINALE DES VARIABLES')
      DO 100 J=1,N
      WRITE(6,002) J, X(J)
002  FORMAT (/,6X,2HX(,I2,2H)=,G13.4)
100  CONTINUE
      PRINT2222
2222  FORMAT(//5X,'TEMPS',9X,'XEXP',10X,'XCALC',9X,'SEXP',10X,'SCALC')
      PRINT1111, (A(I),A(I+10),A(I+20),B(I+10),B(I+20),I=1,10)
1111  FORMAT(5G14.4)
      CALL PLOT(1,A,10,3,10,0)
      CALL PLOT(1,B,10,3,10,0)
      WRITE(6,003) EF
003  FORMAT (//,5X,'VALEUR OPTIMALE DE F =',G16.8)
007  FORMAT(20A4)
008  FORMAT(3(G15.4))
011  FORMAT(5(G15.4))
999  STOP
      END
      SUBROUTINE CALCFX (N,X,F)
      IMPLICIT REAL*8(A-H,D-Z)
      COMMON/FDBJ/T(30),U(30),V(30),CDEF(10),NCDEF,NPTS
      DIMENSION X(N)
      CALL ESTF(F,X)
C      WRITE(6,200) F, (X(I),I=1,N)
200  FORMAT(5G15.8)
      RETURN
      END
      SUBROUTINE BOTM (X,E,N,EF,ESCALE,IPRINT,MAXIT,W,NI,NO,NW)
      IMPLICIT REAL*8(A-H,D-Z)
      DIMENSION X(N), W(NW), E(N)
      WRITE(6,001)
001  FORMAT (///5X,'OPTIMISATION PAR LA METHODE DE POWELL'//10X,
      *'(ALGORITHME BOTM)')
      WRITE(6,002) N, MAXIT, ESCALE
002  FORMAT (///,2X,10HPARAMETRES,///,2X,4HN = ,I2,4X,8HMAXIT = ,I4,4X,
      1 9HESCALE = ,G9.2,///,2X,'ESTIMES DE DEPART'///)
      WRITE(6,222) (I,X(I),I=1,N)
      WRITE(6,223)
223  FORMAT(//2X,'PRECISION RECHERCHEE SUR LES VARIABLES'///)
      WRITE(6,225) (I,E(I),I=1,N)
222  FORMAT(4(2X,2HX(,I2,2H)=,G13.4))

```


LISSAGE DES CINETIQUES DE CROISSANCE PAR LE MODELE DE MONOD

MAR 29, 1976

PAGE 2

```

225  FORMAT(4(2X,2HE(,I2,2H)=,G13.4))
      DIMAG=0.1*ESCALE
      SCER=0.05/ESCALE
      JJ=N*(N+1)
      K=N+1
      NFCC=1
      DO 4 I=1,N
        W(I)=ESCALE
      DO 4 J=1,N
        W(K)=0.
        IF (I-J) 4,3,4
3      W(K)=DABS (E(I))
4      K=K+1
      ITERC=1
      ISGRAD=2
      CALL CALCFX(N,X,F)
5      ITONE=1
      FP=F
      SUM=0.
      IXP=JJ
      DO 6 I=1,N
        IXP=IXP+1
6      W(IXP)=X(I)
      IDIRN=N+1
      ILINE=1
7      DMAX=W(ILINE)
      DACC=DMAX*SCER
      DMAG=DMIN1 (DIMAG,0.1*DMAX)
      DMAG=DMAX1 (DMAG,20.*DACC)
      DIMAX=10.*DMAG
      GO TO (70,70,71),ITONE
70     DL=0.
      D=DMAG
      FPREV=F
      IS=5
      FA=FPREV
      DA=DL
8      DD=D-DL
      DL=D
58     K=IDIRN
      DO 9 I=1,N
        X(I)=X(I)+DD*W(K)
9      K=K+1
      CALL CALCFX(N,X,F)
      NFCC=NFCC+1
      GO TO (10,11,12,13,14,112),IS
14     IF (F-FA) 15,16,24
16     IF (DABS (D)-DMAX) 17,17,18
17     D=D+D
      GO TO 8
18     WRITE (6,019)
19     FORMAT(5X,'LE CHANGEMENT MAXIMUM N''ALTERE PAS LA FONCTION')
      GO TO 20
15     FB=F
      DB=D
      GO TO 21
24     FB=FA
      DB=DA

```

LISSAGE DES CINETIQUES DE CROISSANCE PAR LE MODELE DE MONOD

MAR 29, 1976

PAGE 3

```

      FA=F
      DA=D
21  GO TO (83,23),ISGRAD
23  D=DB+DB-DA
      IS=1
      GO TO 8
83  D=0.5*(DA+DB-(FA-FB)/(DA-DB))
      IS=4
      IF((DA-D)*(D-DB))25,8,8
25  IS=1
      IF(DABS(D-DB)-DDMAX)8,8,26
26  D=DB+DSIGN(DDMAX,DB-DA)
      IS=1
      DDMAX=DDMAX+DDMAX
      DDMA5=DDMA5+DDMA5
      IF(DDMA5.GE.1.0E+60) DDMA5 = 1.0E+60
      IF(DDMAX-DMAX)8,8,27
27  DDMAX=DMAX
      GO TO 8
13  IF(F-FA)28,23,23
28  FC=FB
      DC=DB
29  FB=F
      DB=D
      GO TO 30
12  IF(F-FB)28,28,31
31  FA=F
      DA=D
      GO TO 30
11  IF(F-FB)32,10,10
32  FA=FB
      DA=DB
      GO TO 29
71  DL=1.
      DDMA5=5.
      FA=FP
      DA=-1.
      FB=FHOLD
      DB=0.
      D=1.
10  FC=F
      DC=D
30  A=(DB-DC)*(FA-FC)
      B=(DC-DA)*(FB-FC)
      IF((A+B)*(DA-DC))33,33,34
33  FA=FB
      DA=DB
      FB=FC
      DB=DC
      GO TO 26
34  D=0.5*(A*(DB+DC)+B*(DA+DC))/(A+B)
      DI=DB
      FI=FB
      IF(FB-FC)44,44,43
43  DI=DC
      FI=FC
44  GO TO (86,86,85),ITONE
85  ITONE=2

```

LISSAGE DES CINETIQUES DE CROISSANCE PAR LE MODELE DE MONOD
MAR 29, 1976 PAGE 4

```

      GO TO 45
86 IF (DABS (D-DI)-DACC) 41,41,93
93 IF (DABS (D-DI)-0.03*DABS (D)) 41,41,45
45 IF ((DA-DC)*(DC-D)) 47,46,46
46 FA=FB
   DA=DB
   FB=FC
   DB=DC
   GO TO 25
47 IS=2
   IF ((DB-D)*(D-DC)) 48,8,8
48 IS=3
   GO TO 8
41 F=FI
   D=DI-DL
   DD=DSORT ((DC-DB)*(DC-DA)*(DA-DB)/(A+B))
   DO 49 I=1,N
   X(I)=X(I)+D*W(IDIRN)
   W(IDIRN)=DD*W(IDIRN)
49   IDIRN=IDIRN+1
   W(ILINE)=W(ILINE)/DD
   ILINE=ILINE+1
   IF(IPRINT-1)51,50,51
50 WRITE(6,52)ITERC,NFCC,F,(X(I),I=1,N)
52 FORMAT(/10H ITERATION,IS,I15,'EVALUATIONS DE F',10X,3HF =,G15.8/
+1X,'X=',2(G16.8,2X))
   GO TO(51,109),IPRINT
51 GO TO (55,38),ITONE
55 IF (FPREV-F-SUM) 94,95,95
95 SUM=FPREV-F
   JIL=ILINE
94 IF (IDIRN-JJ) 7,7,92
92 FHOLD=F
   IS=6
   IXP=JJ
   DO 59 I=1,N
   IXP=IXP+1
59   W(IXP)=X(I)-W(IXP)
   DD=1.
   GO TO 58
112 IF(FP-F) 37,37,91
91 D=2.*(FP+F-2.*FHOLD)/(FP-F)**2
   IF (D*(FP-FHOLD-SUM)**2-SUM) 87,37,37
87 J=JIL*N+1
   IF (J-JJ) 60,60,61
60 DO 62 I=J,JJ
   K=I-N
62   W(K)=W(I)
   DO 97 I=JIL,N
97   W(I-1)=W(I)
61 IDIRN=IDIRN-N
   ITONE=3
   K=IDIRN
   IXP=JJ
   AAA=0.
   DO 67 I=1,N
   IXP=IXP+1
   W(K)=W(IXP)

```

PROGRAMME 3 (suite)

LISSAGE DES CINETIQUES DE CROISSANCE PAR LE MODELE DE MONOD

MAR 29, 1976

PAGE 5

```

      IF (AAA-DABS (W(K)/E(I))) 66,67,67
66 AAA=DABS (W(K)/E(I))
67 K=K+1
      DD MAG=1.
      W(N)=ESCALE/AAA
      ILINE=N
      GO TO 7
37 IXP=JJ
      AAA=0.
      F=FHOLD
      DO 99 I=1,N
      IXP=IXP+1
      X(I)=X(I)-W(IXP)
      IF (AAA+DABS (E(I))-DABS (W(IXP))) 98,99,99
98 AAA=DABS (W(IXP)/E(I))
99 CONTINUE
      GO TO 72
38 AAA=AAA*(1.+DI)
72 CONTINUE
      IF (IPRINT-2) 109,50,50
109 IF (AAA-0.1) 20,20,76
76 IF (F-FF) 35,78,78
78 WRITE (6,80)
80 FORMAT(5X,'LA PRECISION EST LIMITEE PAR LES ERREURS SUR F')
      GO TO 20
35 DD MAG=0.4*DSQRT(DABS(FF-F))
      IF (DD MAG.GE.1.0E+60) DD MAG = 1.0E+60
      ISGRAD=1
108 ITERC=ITERC+1
      IF (ITERC-MAXIT) 5,5,81
81 WRITE (6,82) MAXIT
82 FORMAT(15,'ITERATIONS ONT ETE EFFECTUEES SANS ATTEINDRE LA'
* ,/,5X,'PRECISION RECHERCHEE')
20 EF=F
      RETURN
      END
      DOUBLE PRECISION FUNCTION FONC(Z,Y,X)
      IMPLICIT REAL*8(A-H,O-Z)
      COMMON/PH/L
      DIMENSION Y(2),X(10)
      GO TO (10,20,30),L
10 AAA=X(1)*Y(1)+Y(2)/(Y(2)+X(2))
      FONC=AAA
      RETURN
20 FONC=-AAA/X(3)
      RETURN
30 FONC=0.0D0
      RETURN
      END
      SUBROUTINE ESTF(F,X)
      IMPLICIT REAL*8(A-H,O-Z)
      COMMON/PHJ/J
      COMMON/FOBJ/T(30),U(30),V(30),CDEF(10),NCDEF,NPTS
      DIMENSION Y(50),YINIT(50),YVALUE(3,100),EMAX(50),ERROR(50),X(10)
      COMMON/MIUMIU/A(144),B(144)
      F1=0.0
      F2=0.0
      N=2

```

PROGRAMME 3 (suite)

LISSAGE DES CINETIQUES DE CROISSANCE PAR LE MODELE DE MONOD

MAR 29, 1976

PAGE 6

```

XD=T(1)
XN=T(2)
DZ=.2D0
YINIT(1)=1.1
YINIT(2)=21.2
NMAX=100
NPRINT=0
DO 2 I=1,N
2   EMAX(I)=0.10D-3
    K=4
    KPAS=0
    A(1)=T(1)
    B(1)=T(1)
    A(11)=YINIT(1)
    A(21)=A(11)
    B(11)=YINIT(2)
    B(21)=B(11)
    DO 1 I=2,NPTS
    CALL RKM234(N,XD,XN,DZ,ERROR,YINIT,NMAX,NPRINT,XVALUE,
1YVALUE,EMAX,K,KPAS,X)
    YINIT(1)= YVALUE(1,J)
    YINIT(2)= YVALUE(2,J)
    XD=XN
    XN=T(I+1)
    A(I)=T(I)
    B(I)=T(I)
    A(I+10)=U(I)
    A(I+20)=YINIT(1)
    B(I+10)=V(I)
    B(I+20)=YINIT(2)
    F1=F1+(U(I)-YVALUE(1,J))* (U(I)-YVALUE(1,J))
    F2=F2+(V(I)-YVALUE(2,J))* (V(I)-YVALUE(2,J))
1   CONTINUE
    F=F1+F2
    A(144)=0.0
C   CALL PLOT(1,A,10,3,10,0)
    RETURN
    END
    SUBROUTINE RKM234(N,XD,XN,DZ,ERROR,YINIT,NMAX,NPRINT,XVALUE,
UYVALUE,EMAX,K,KPAS,XX)
    IMPLICIT REAL*8(A-H,D-Z)
    COMMON/PA/L
    COMMON/PAJ/J
    DIMENSION DY1(50),DY2(50),DY3(50),DY4(50),DY5(50),XX(10)
    DIMENSION DDY(50),YVALUE(3,200),YINIT(3),Y(3)
    DIMENSION EMAX(3),ERROR(3)
    DX=DZ
    X1=XD
    JCOUNT=0
    J=1
    XVALUE=X1
12  DO 9 I=1,N
    Y(I)=YINIT(I)
9   YVALUE(I,J)=YINIT(I)
    GO TO 11
13  DO 15 JX=1,N
15  Y(JX)=YVALUE(JX,J)
11  JJ=0

```

LISSAGE DES CINETIQUES DE CROISSANCE PAR LE MODELE DE MONOD

MAR 29, 1976

PAGE 7

```

JCOUNT=JCOUNT+1
A=DX/3.0D0
X1=XVALUE+A
DO 10 L=1,N
10  DY1(L)=A*FONC(XVALUE,Y,XX)
DO 101 L=1,N
101  Y(L)=Y(L)+DY1(L)
DO 102 L=1,N
102  DY2(L)=A*FONC(X1,Y,XX)
DO 103 L=1,N
103  Y(L)=YVALUE(L,J)+(DY1(L)+DY2(L))/2.0D0
DO 104 L=1,N
104  DY3(L)=A*FONC(X1,Y,XX)
X2=XVALUE+DX/2.0
DO 105 L=1,N
105  Y(L)=0.3750*(DY1(L)+3.0*DY3(L))+YVALUE(L,J)
DO 106 L=1,N
106  DY4(L)=A*FONC(X2,Y,XX)
X3=XVALUE+DX
DO 107 L=1,N
107  Y(L)=1.50*(DY1(L)-3.0*DY3(L)+4.0*DY4(L))+YVALUE(L,J)
DO 108 L=1,N
108  DY5(L)=A*FONC(X3,Y,XX)
DDY(L)=0.5*(DY1(L)+4.0*DY4(L)+DY5(L))
YVALUE(L,J+1)=YVALUE(L,J)+DDY(L)
Y(L)=YVALUE(L,J+1)
IF(Y(L).NE.0.0) GO TO 209
ERROR(L)=0.0
GO TO 108
209  ERROR(L)=DABS(-(DY1(L)-4.5*DY3(L)+4.*DY4(L)-.5*DY5(L))/Y(L))
108  CONTINUE
C    IF(KPAS.EQ.1)WRITE(6,120)(ERROR(I),I=1,N)
120  FORMAT(2X,'ERREURS DE TRONCATURE',40(/,4X,D14.7),/)
IF(KPAS)112,112,113
112  DO 111 L=1,N
112  IF(ERROR(L).GT.EMAX(L))GO TO 66
IF(ERROR(L).LT.(EMAX(L)/(2.0**K)) )JJ=JJ+1
111  CONTINUE
113  CONTINUE
XVALUE=XVALUE+DX
IF(XVALUE.GT.XN)GO TO 65
IF(NPRINT) 17,17,75
C75  WRITE(6,200)XVALUE,(YVALUE(I,J+1),I=1,N)
75  CONTINUE
17  J=J+1
IF(JJ.EQ.N)DX=DX*2.0
IF(XVALUE.EQ.XN.OR.JCOUNT.EQ.NMAX)GO TO 85
GO TO 11
65  XVALUE=XVALUE-DX
DX=XN-XVALUE
GO TO 13
66  DX=DX/2.0
IF(J.EQ.1)GO TO 12
GO TO 13
C85  WRITE(6,202)JCOUNT,XVALUE,(YVALUE(L,J),L=1,N)
85  CONTINUE
IF(XVALUE.GT.(XN-.1E-5))GO TO 96
C    WRITE(6,201)NMAX

```

LISSAGE DES CINETIQUES DE CROISSANCE PAR LE MODELE DE MONOD

MAR 29, 1976

PAGE 8

```

96  CONTINUE
200  FORMAT(1X,'XVALUE=',614.7,10X,'YVALUE=',614.7,
      *40(//,40X,614.7),//)
      RETURN
      END
      SUBROUTINE PLOT(N0,A,N,M,NL,NS)
      IMPLICIT REAL*8(A-H,O-Z)
      DIMENSION YPR(11),A(1)
      INTEGER ANG(9),OUT(101),BLANK
      DATA ANG//'+','+', 'E', '4', '5', '6', '7', '8', 'I'//, BLANK//
99   FORMAT(//20X,'SUBSTRAT(DBO) VS TEMPS(HRS)',//)
98   FORMAT(//20X,'MICRO-ORGANISMES(SSV) VS TEMPS(HRS)',//)
2    FORMAT(1H ,E9.3,1X,61A1)
3    FORMAT(1H )
7    FORMAT(1H ,10X,61H.
1    .
8    FORMAT('0',2X1P07E10.2)
9    FORMAT(1H1)
      WRITE(6,9)
      NLL=NL
      IF(NS) 16,16,10
10   DO 15 I=1,N
      DO 14 J=1,N
      IF(A(I)-A(J)) 14,14,11
11   L=I-N
      LL=J-N
      DO 12 K=1,M
      L=L+N
      LL=LL+N
      F=A(L)
      A(L)=A(LL)
12   A(LL)=F
14   CONTINUE
15   CONTINUE
16   IF(NLL) 20,18,20
18   NLL=50
20   CONTINUE
      XSCAL=(A(N)-A(1))/(DFLOAT(NLL-1))
      M1=N+1
      YMIN=A(M1)
      YMAX=YMIN
      M2=M+N
      DO 40 J=M1,M2
      IF(A(J)-YMIN)28,26,26
26   IF(A(J)-YMAX)40,40,30
28   YMIN=A(J)
      GO TO 40
30   YMAX=A(J)
40   CONTINUE
      YSCAL=(YMAX-YMIN)/60.
      YPR(1)=YMIN
      DO 90 KN=1,5
90   YPR(KN+1)=YPR(KN)+YSCAL*10.
      YPR(7)=YMAX
      WRITE(6,8) (YPR(IP),IP=1,7)
      WRITE(6,7)
      XB=A(1)
      L=1

```


LISSAGE DES CINETIQUES DE CROISSANCE PAR LE MODELE DE MONOD

MAR 29, 1976

PAGE 9

```
      MY=M-1
      I=1
45     F=I-1
      XPR=XB+F*XSCAL
      50     DO 55 IX=1,61
      55     OUT (IX)=BLANK
      DO 60 J=1,MY
      LL=L+J*N
      JP=((A(LL)-YMIN)/YSCAL)+1.
      OUT (JP)=ANG (J)
      OUT (61)=ANG (9)
      OUT (1)=ANG (9)
      60     CONTINUE
      WRITE (6,2) XPR, (OUT (IZ), IZ=1,61)
      L=L+1
      I=I+1
      IF (I-NLL) 45,84,86
      84     XPR=A (N)
      GO TO 50
      86     WRITE (6,7)
      C      WRITE (6,98)
      RETURN
      END
```

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. AHLBERG, J.H., WILSON, E.N. et WALSH, J.L., The Theory of Splines and their Applications, Academic Press, New York, (1967).
2. ARBA, S. et al., Biochemical Engineering, Academic Press, New York, (1965), 333 p.
3. ARIMA, K. et al., Yeasts, W. Junk, The Hague, (1957), 246 p.
4. CHAI, A.S., Simulation, V.15, #4, (1970), p.6.
5. Contribution à l'étude et aux utilisations industrielles des tourbes françaises, 2ième partie Chapitre V et VI, Annales des Mines, (Mai 1947), pp.64-73.
6. HANG, R., Computer Drawn Curves Using Splines techniques. Engineering Design Graphics Journal, (1975).
7. HARRINGTON, P., Simulation des performances d'une usine de traitement des eaux usées, Mémoire de maîtrise, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada, (1976).
8. HUMPHRET, A., Current Developments in Fermentation, Chemical Engineering, (Déc. 1974), pp. 98-112.

9. JOHNSON, J.Y., Improvements in the Cultivation of Micro-organisms, Patent specification No. 7893/29,(1930).
10. KUSTER, E., Studies on Irish Peat Bogs and their Microbiology, Microbiola Espanola, V. 16, #3,(1963),pp. 203-208.
11. LEDUY, A., Submerged Cultivation of Morel Mushroom Mycelium in Waste Sulfite Liquors, Ph.D. Thesis, The University of Western Ontario, London, Canada, (1974).
12. LIPINSKY, E.S. et LITCHFIELD, J.H., Algae Bacteria and Yeasts as Food or Feed, CRC Critical Review in Food Technology, (Dec. 1970), pp.581-618.
13. LOBANOK, A.G. et al., Enzymic Hydrolysis of Polysaccharides of Peat Moss. ISPOL'ZOVANIE MIKROORGANIZMOV IKH METABOLITOV U NARODNOM KHOZYAISTVE, (1973), pp.60-65.
14. LODDER, J. The Yeasts, North-Holland Publishing Company, Amsterdam, (1970), 1385 p.
15. LUEDEKING, R., Fermentation Process Kinetics, Biochemical and Biological Engineering Sciences, V.1, Academic Press, New-York, (1967), pp.181-243.

16. MAC LOUGHLIN, A.J. et KUSTER, E. Utilisation of Peat I
Methods of Obtaining Fermentable Substrates, Proceedings
of Royal Irish Academy, V.72, Section B, (1972),pp. 1-7.
17. MAC LOUGHLIN, A.J. et KUSTER, E., Utilisation of Peat II
Preliminary Investigations on Factors Influencing Small Scale
Production of Candida Utilis, Proceedings of Royal Irish
Academy, V. 72, Section B, (1972), pp.8-17.
18. MAC LOUGHLIN, A.J. et KUSTER, E., Utilisation of Peat III
A Study of Acid Catalysed Peat Extract, Proceedings of Royal
Irish Academy, V. 72, Section B, (1972),pp. 18-24.
19. MONOD, J.,Recherches sur la croissance des cultures bactériennes,
Hermann et Cie, Paris (1942).
20. MOO-YOUNG, M., The Food Crisis and the Chemical Industry,
Chemistry in Canada, (June 1975), pp.14-17.
21. MORRIS, D.L., Quantitative Determination of Carbohydrates with
Dreywood's Anthrone Reagent, Science, 107, (1948), pp. 254-255.
22. NEISH, A.C., Analytical Methods for Bacterial Fermentations,
N.R.C. Can., Report No. 46-8-3, 2nd Revision, (1952).

23. POWELL, M.J.D., Finding Minima of Functions of Several Variables without Calculating Derivatives, Computer Journal, V. 7, (1965), pp. 303-307.
24. POWELL, M.J.D., A Survey of Numerical Methods for Unconstrained Optimization, SIAM Review, V. 12, (1970), p. 79.
25. RISI, J. et al, A Chemical Study of the Peats of Quebec, Departement des Mines, Province de Québec, Canada, (1950), 25 p.
26. ROSE, A.H. et HARRISON, J.S., The Yeasts, V. 1,2,3, Academic Press, New-York, (1969).
27. SINGH, K. et al, Arch. Biochem., V. 18, (1949), p. 181.
28. SISKOVA, Z. KALNINA, V., et GAILITIS, S.J., Growth of Fodder Yeast Peat Hydrolysate, Akademiic Nauk Latviiskoi ssr. Riga, V. 11, (1963), pp. 91-95.
29. SHIMANSKII, V.S. et al, Use of Sphagnum Peats with a Low Degree of Decomposition for Preparing Nutrients Yeast and Peat Compounds Enriched with Proteins, Uspekhi Tekhnicheskoi Mikrobiologii, (1968), pp. 68-75.

30. SHISHKOVA, Z.P. et GAILITI, S.J., Preparation of Peat Substrates and Growth of Yeasts, Giprolitich. Biokhim. Pererab. Torfa slaboi stepeni razloz heniga, (1971) pp. 140-152.
31. SMITH, G., An Introduction to Industrial Mycology, Edward Arnold Ltd, London, (1969), 390 p.
32. SOLOMONS, G.L., Materials and Methods in Fermentation, Academic Press, New-York, (1969), 331 p.
33. STRELKOV, S.S., Carbohydrates from Peat and their Utilisation, Torfyanaya prom, V. 35, #7, (1958).
34. THANH, N.C. et SIMARD, R.E., Traitement biologique des eaux usées domestiques par les levures, Eau du Québec, V. 6, #3, (1973).
35. VEBRIENE, V. et al. Production of Protein Fodder Yeast from Peat Hydrolyzate, Lietuvos Tsr Aukstuju Možyklu Mokslo Darbai iologisa, V. 5, (1965) pp. 19-22.
36. WAYMAN, M., How Single Cell Protein Will Help Control Food Costs, Chemistry in Canada, (September 1975), pp.22-24.
37. WORGAN, J.T., Culture of the Higher Fungi, Progress in Industrial Microbiology, V. 8, J. & A. Churchill Ltd, London (1968), pp.74-139.